



Bachelorarbeit

zur Erlangung des Grades Bachelor of Science (B.Sc.) Geowissenschaften an der
mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam

Identifikation von Eukaryoten (Algen, Pilzen, Pflanzen und Säugetieren) mittels sedimentärer DNA aus spätpleistozänen Torfen der Insel Bolshoy Lyakhovsky, Russland

Vorgelegt bei

Prof. Dr. Ulrike Herzschuh

Alfred-Wegener Institut
für Polar- und Meeresforschung

Forschungsstelle Potsdam

apl. Prof. Dr. Martin H. Trauth

Institut für Erd- und
Umweltwissenschaften

Universität Potsdam

Ellen Schnabel

Matrikelnummer 770838

Potsdam, den 20. September 2016

Zusammenfassung

Die Rekonstruktion von Paläoumwelt und Paläoklima ist ein aktuelles Forschungsgebiet sowohl in der Biologie als auch in der Geowissenschaft, von dem man sich Hinweise auf Ursachen und Auswirkungen heutiger Klimaveränderungen erhofft. Häufig verwendete Klimaproxies sind dabei Pollen, Makrofossilien und zunehmend auch DNA-Reste. In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob sich aus pleistozänen sibirischen Torfen mittels der Analyse von aDNA Hinweise auf die zu dieser Zeit vorherrschende Flora und Fauna finden lassen.

Zunächst wurde aus drei Torfproben im Alter von 200.000 und 20.000 Jahren alte DNA extrahiert und mittels Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung von spezifischen Primern für Gefäßpflanzen, Pilze, Moose, Säugetiere, Diatomeen und Ringelwürmer das Vorhandensein von alter DNA nachgewiesen. Dabei lieferte die jüngste Probe die besten Ergebnisse. Mittels Klonierung, Sangersequenzierung und Sequenzanalyse konnten die in dieser Probe amplifizierten PCR-Produkte bis auf die taxonomische Ebene der Familie identifiziert werden. Die Ergebnisse für die Pflanzen wurden mit einer an der gleichen Probe durchgeführten Pollenanalyse verglichen, welche ebenfalls eine Bestimmung der Taxa auf Familienebene lieferte. Beide Analysen lieferten ähnliche Taxa, wobei bei der Pollenanalyse eine etwas höhere Diversität erreicht wurde. Neben der Identifizierung von Paläoindikatoren wie Diatomeen, deren Analyse auch mikroskopisch durchführbar wäre, lieferte die DNA-Analyse auch Hinweise auf Organismen wie Säugetiere, Pilze und andere Eukaryoten, die allein anhand von morphologischen Methoden schwer oder gar nicht nachzuweisen sind.

Die gefundenen Taxa der untersuchten Eukaryotengruppen deuten auf raue Umweltbedingungen und eine freie, tundrenartige Landschaft hin. Dies ist in Übereinstimmung mit zahlreichen Untersuchungen von Sedimenten, welche aus derselben Region und demselben Ablagerungszeitraum stammen.

Es wurde somit gezeigt, dass die Analyse der in sibirischen Torfen enthaltenen DNA sich zum Nachweis verschiedener Eukaryotengruppen eignet, welche teilweise nicht mit mikroskopischen Methoden nachgewiesen werden können und somit detailliertere Hinweise auf die Umweltbedingungen geben können. Um allerdings mehr Informationen über die Vielfalt der taxonomischen Zusammensetzung zu erhalten, sollte in Zukunft neben einer Pollenanalyse die gesamte genomische DNA sequenziert werden. Dadurch entstehen größere Datenmengen, welche mittels bioinformatischer Auswertung genauere Umweltrekonstruktionen zulassen würden.

Summary

Biologists as well as geologists try to reconstruct the paleoenvironment and paleoclimate in order to identify the causes and consequences of contemporary climate changes. Frequently pollen, macrofossils and increasingly DNA-remains are used as climate proxies. In this thesis, ancient DNA from Siberian peat samples from the Pleistocene are investigated to check whether it is possible to find evidence of the prevailing biota.

DNA was extracted from three peat samples from the Russian Bolshoy Lyakhovsky Island, previously dated to be 200.000 and 20.000 years old. Using specific primers for vascular plants, fungi, mosses, mammals, diatoms and oligochaete worms, it was possible to amplify DNA via polymerase chain reaction from all samples. The youngest peat yielded the best results and was investigated further. After cloning, sequencing and sequence analysis, the PCR products could be identified to the taxonomic level of families. The results for the plants were compared with a pollen analysis of the same sample, which also yielded taxa at family level. Both analyses provided similar taxa, but the diversity of the pollen analysis was higher. In addition to paleoindicators like diatoms, which could also have been identified microscopically, DNA analysis yielded evidence of organisms like mammals, fungi and other eucaryotes that cannot or not easily be identified by morphological methods.

The identified taxa indicate harsh environmental conditions in a tundra-like steppe. This is in agreement with numerous studies where sediments from the same region and the same age were analyzed.

In this thesis, it could thus be demonstrated that ancient DNA from Siberian peats is suitable to detect several eucaryotic species, some of which cannot be identified with microscopic methods. Using the results, it is possible to derive evidence of the climatic and environmental conditions. However, in addition to pollen analyses, future work should focus on obtaining more information about the variety of eucaryotes by sequencing the whole DNA of the samples. Larger amounts of data in connection with bioinformatic evaluation will permit a more detailed reconstruction of the paleoenvironment.

Inhalt

1. Einleitung.....	5
1.1 Klimarekonstruktion	5
1.2 Das Pleistozän.....	5
1.3 Torf	8
1.4 Pollen.....	8
1.5 DNA.....	9
1.5.1 Aufbau der DNA.....	9
1.5.2 Alte DNA	10
2. Aufgabenstellung.....	11
3. Material und Methoden	11
3.1 Herkunft der Proben.....	11
3.1.1 Die Bolshoy Lyakhovsky Insel	11
3.1.2 Die Beprobungsorte	12
3.2 Methoden.....	14
3.2.1 Subbeprobung in der Klimakammer	14
3.2.2 Extraktion der DNA.....	16
3.2.3 PCR.....	16
3.2.4 Gelelektrophorese	19
3.2.5 Aufreinigung	20
3.2.6 Klonierung	20
3.2.7 Sequenzierung	22
3.2.8 Sequenzanalyse	22
3.2.9 Pollenanalyse.....	23
4. Ergebnisse.....	24
4.1 Initiale PCRs	24
4.2 Auswahl der PCR-Produkte	26
4.3 Aufreinigung	26
4.4 Ergebnisse der Sequenzanalyse	26
4.5 Ergebnisse der Pollenanalyse	33
5. Diskussion.....	37
5.1 Wahl der Primer und initiale PCRs	37
5.2 Diversität	39
5.2.1 Genetik	39
5.2.2 Pollenanalyse.....	40
5.2.3 Vergleich DNA-Pollen	40

5.3 Umweltrekonstruktion	41
6. Zusammenfassung und Ausblick	42
7. Danksagung	43
8. Anhang.....	44
8.1 Chemikalien und Geräte.....	44
8.2 Sequenzen der Klone.....	47
8.3 Mastermix der Säugetier-PCR	51
8.4 Abkürzungsverzeichnis	52
9. Literaturverzeichnis.....	53

1. Einleitung

1.1 Klimarekonstruktion

Das Klima der Erde befindet sich im stetigen Wandel. Die Ursachen dieses Wandels liegen vor allem in der Änderung der Erdumlaufbahn, der Änderung der Sonneneinstrahlung und der Plattentektonik.

Zur Rekonstruktion des Paläoklimas zieht man Rückschlüsse aus sogenannten „Klimaproxies“. Isotopenverhältnisse, z.B. das Verhältnis von ^{18}O zu ^{16}O oder von ^{13}C zu ^{14}C , geben Auskunft über die Temperatur. Geochemische Proxies, z.B. der Kalkgehalt von Sedimenten, geben Hinweise auf den CO_2 -Gehalt der Luft. Korngrößenveränderungen weisen auf Änderungen der Fließgeschwindigkeiten und damit auf Veränderungen von Niederschlägen oder von Tauwasser hin. Mithilfe von biologischen Proxies kann man Aussagen über die Vegetation und das Paläoklima erhalten. Besonders Pollen, Diatomeen und Foraminiferen werden hierzu verwendet. Seit den Fortschritten in der Biochemie und Molekularbiologie, insbesondere seit der Erfindung der Polymerase-Kettenreaktion (Mullis und Faloona 1987), kann man auch anhand von DNA-Resten Informationen über die Paläoflora und -fauna gewinnen und durch Vergleich mit heutigen Ökosystemen das Klima rekonstruieren.

1.2 Das Pleistozän

Am Ende des Tertiärs, vor ca. drei Millionen Jahren, kam es weltweit zu einer Abkühlung des Klimas. Mit Beginn des Pleistozäns vor 2,58 Millionen Jahren (International Commission on Stratigraphy 2012) begann ein Wechsel von periodisch auftretenden Kalt- und Warmzeiten. Während große Teile Eurasiens und Nordamerikas von riesigen Eiskappen bedeckt waren, blieb der Nordosten Eurasiens weitgehend eisfrei (Hubberten 2004). Allerdings zeigt das Vorhandensein von Eiskeil-pseudomorphosen, d.h. mit Sediment verfüllte ehemalige Eiskeile, dass zu dieser Zeit erstmals Permafrost auftrat. Kontinuierliche Permafrostbedingungen sind seit ca. 600.000 Jahren in Sibirien nachgewiesen, die auch während der Warmzeiten erhalten blieben (Lozán und Lozán 2014).

Auch für das Gebiet der Laptev-See wurden aus lithostratigraphischen, biostratigraphischen und chronostratigraphischen Informationen von zahlreichen Einzelproben Hinweise auf große Veränderungen der Umweltbedingungen während des Pleistozäns gefunden. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die großen stratigraphischen Einheiten in Sibirien und die entsprechenden Perioden in Europa.

Tabelle 1: Stratigraphische Einheiten des Pleistozäns (nach Andreev et al. 2011).

Alter (kyr)	Sibirische Nomenklatur	Westeuropäische Nomenklatur	MIS	Stratigraphische Einheit	vorherrschende Ablagerungen
10.3 - 0	Holozän	Holozän	MIS 1	Alas Sequenz	Moor- und See-sedimente, Eiskeile
30 - 10.3	Sartan	spätes Weichsel-Glazial	MIS 2	Yedoma Suite	Eiskomplexbildung, Paläoböden
50 - 30	Karginsky	mittleres Weichsel-Glazial	MIS3/MIS4	Yedoma Suite (Molotkov)	Eiskomplexbildung, Paläoböden
110 - 50	Ermakovo, Zyryan	frühes Weichsel-Glazial	MIS4/MIS5a-d	Kuchchugui Suite	Ablagerungen infolge Überflutung
130 - 115	Kazansevo	Eem-Interglazial	MIS5e	Krest Yuryakh Suite	Thermokarst- und Seesedimente
200 - 130	Tazovsky	spätes Saale-Glazial	MIS6/MIS7	Yukagir Suite	Eiskomplexbildung und Torf

Innerhalb dieser Einteilung konnten mittels Pollenanalysen einige Klimabedingungen genauer rekonstruiert werden (Andreev et al. 2011). Diese sind in Tabelle 2 aufgeführt. Ein Großteil der ausgewerteten Proben stammt dabei von der Bolshoy Lyakhovsky Insel. Hier wurden auch die ältesten Pollenproben in dieser Region geborgen (Andreev et al. 2004). Sie sind älter als 200.000 Jahre und konnten der Kaltzeit MIS7a zugeordnet werden (Andreev et al. 2011).

In allen Zeiten war die Vegetation hauptsächlich von Poaceae und Cyperaceae geprägt, wobei meist mehr Poaceae als Cyperaceae vorhanden waren. Die genaue Rekonstruktion der Umwelt gründet sich daher einerseits auf die Menge der gefundenen Pollen, andererseits auf die Art der zusätzlich zu Poaceae und Cyperaceae vorhandenen Pflanzen. So treten zum Beispiel Bäume und Sträucher nur während der wärmeren Perioden auf, wenn auch Wiesenpflanzen wie Artemisia oder Caryophyllaceae zu finden sind (Andreev et al. 2011).

Tabelle 2: Klima und Vegetation des Pleistozäns im Bereich der Laptevsee (nach Andreev et al. 2011).

	Name	Zeit (kyr)	Besonderheiten	vorherrschende Gräser und Kräuter	Bäume und Sträucher	Vegetationstyp	Klima
1	Late Saalian Stadial	vor 200		wenige Pollen, Poaceae > Cyperaceae			kalt
2	Late Saalian (Tazovsky) Interstadial	200 - 190	mächtige Torfablagerungen, hohe biologische Produktivität	viele Pollen Poaceae > Cyperaceae	vereinzelt Weiden	offene, nasse Gras-Sauergras-tundra	
3	Pre-Eemian Stadial	190 - 130		wenig Pollen Poaceae > Cyperaceae, zeitweise Caryophyllaceae, zeitweise Riccia	wenig <i>Pinus</i>	spärlicher Grasbewuchs	kühler, trockener als vorher
4	Eemian (Katzantsevo) Interglacial	139 - 110		Poaceae, <i>Artemisia</i>	<i>Alnus fructiosa</i> , <i>Salix</i> , <i>Betula nana</i>	Steppe, Tundra-Steppe mit Büschen, an einigen Stellen Wald	warmer Sommer
5	Early Weichselian (Ermakovo, Zyryan) Stadial	110 - 50	wenig Informationen	wenig Pollen, Poaceae, Cyperaceae		spärliche Vegetation, Tundra, Steppe	raue Umweltbedingungen
6	Middle Weichselian (Karginsky) Interstadial	50 - 40		Poaceae, Cyperaceae, <i>Artemisia</i>	<i>Salix</i>	Tundra, Steppe	warmer Sommer, feuchteste und wärmste Periode im Pleistozän
		40 - 30	Torflinsen und Torfböden, Hinweise auf Viehherden	mehr Pollen Poaceae, Cyperaceae, <i>Artemisia</i> , Caryophyllaceae	<i>Salix</i>	Grasland, Steppe, Wiese	
7	Late Weichselian (Sartan) Stadial	30 - 13	lokal Viehherden, Knochenfunde	wenig Pollen, meist Poaceae, etwas Cyperaceae, <i>Artemisia</i> , Brassicaceae, Caryophyllaceae, frostunempfindliche Pflanzen		offene Tundra, Steppe, aber auch Sedimente aus wasserreicheren Umgebungen, z.B. aus Tümpeln	kalte und trockene Sommer, sehr kalte Winter
8	Interglacial Transition	13 - 10		Cyperaceae > Poaceae,	<i>Salix</i> , <i>Betula nana</i>	stark mit Büschen bewachsene Tundra	Klima vorteilhafter als heute, Sommer 8 - 12°C

1.3 Torf

„Torf ist das Produkt der unvollständigen Zersetzung abgestorbener pflanzlicher Substanz unter Luftabschluss, vor allem in Mooren, wobei die Struktur des Pflanzenmaterials erhalten bleibt“ (Press et al. 2011). Moorböden sind immer wassergesättigt, außerdem sind sie im Vergleich zur Umgebung kühler. Einige Moorpflanzen (z.B. Torfmoose) geben bei ihrem Stoffwechsel Wasserstoffionen an die Umgebung ab und sorgen so für eine saure Umgebung. Deshalb gibt es in Mooren nur wenige Bodenlebewesen, die die abgestorbenen Pflanzen zerkleinern könnten. Folglich bleiben Pflanzenteile erhalten. Unter der Pflanzendecke von Mooren findet man daher mehr oder weniger mächtige Schichten von Torf (Göttlich 1990). Man unterscheidet je nach Zersetzungsgrad und dem Gehalt an anorganischem Material viele unterschiedliche Arten von Torf. Allen Torfen gemein ist, dass sie in der Tiefe außergewöhnlich stabil sind. Das liegt daran, dass sie keinen beständigen Nachschub an Sauerstoff erhalten, da sie von Wasser durchtränkt sind. Damit fehlen aerobe Destruenten. Außerdem ist in den Torfen der Stickstoff in Huminstoffen fixiert, sodass mikrobieller Zugriff und damit der Abbau unmöglich ist. Folglich findet man in Torfen Pflanzenreste in sehr guten Erhaltungszuständen, wie zum Beispiel Moose, bei denen noch die einzelnen kleinen Blätter erkennbar sind.

Nur im oberen Bereich des Moores können Pflanzen mineralisiert oder humifiziert werden. Da auf dem Untergrund aber wieder neue Pflanzen wachsen, kommen die alten Pflanzenreste bald in den vorwiegend nassen, sauerstoffarmen Untergrund. Dort werden sie dann wie oben beschrieben konserviert (Göttlich 1990).

In Torfen sind folglich Pflanzen und Strukturen des pflanzlichen Ausgangsmaterials erhalten. An der Zusammensetzung von Torfen lassen sich frühere Vegetations- und Klimaverhältnisse ablesen (Göttlich 1990).

1.4 Pollen

Die Samenpflanzen der Erde bilden Pollen. Diese verbreiten sich durch Tiere, Wasser und besonders den Wind. Dieser transportiert die Pollen bis zu einige hundert Kilometer weit, bevor sie zusammen mit dem ebenfalls im Wind transportierten organischen und anorganischen Material in Sedimenten abgelagert werden. Durch chemische Verfahren lassen sich die Pollen vom übrigen Material trennen und unter dem Mikroskop untersuchen. Die einzelnen Pollen unterscheiden sich dabei in Größe (10 - 100 μm), Form und Oberflächenstruktur. So gibt es zum Beispiel Pollen mit Poren und solche, die Colpen besitzen. Auch besitzen einige Pollen Luftsäcke, während andere Pollen eher durch ihren gut ausgeprägten Rand auffallen. Anhand dieser Merkmale ist es möglich, die Pollen Arten oder zumindest einer Pflanzengattung zuzuordnen. Hat man alle Pollen einer Probe bestimmt, kann die Pflanzengemeinschaft des Ablagerungszeitraumes bestimmt werden. Mit diesem Wissen wiederum kann indirekt auf das Klima im Bildungszeitraum der Pollen geschlossen werden, da die Pollen, welche in den Proben enthalten sind, von Pflanzen stammen müssen, die zu den damals vorherrschenden Bedingungen überleben konnten. So ist es möglich, auch für Zeitabschnitte mit schnell wechselndem

unterschiedlichem Klima, wie zum Beispiel dem Pleistozän, einzelne Klimaphasen zu unterscheiden, die mit anderen, z.B. isopenchemischen Methoden, nicht in dieser Feinheit getrennt werden können.

1.5 DNA

1.5.1 Aufbau der DNA

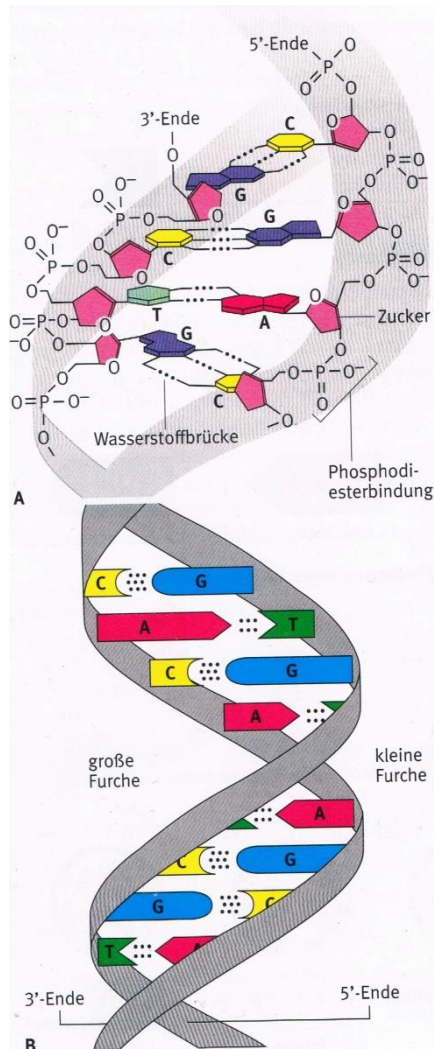


Abbildung 1: Aufbau der DNA
(Baron 2009)

Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist ein in allen Lebewesen vorkommendes Molekül und Träger der Erbinformation. Die DNA kommt im Zellkern vor, aber auch in Mitochondrien und Chloroplasten ist DNA enthalten. Die DNA aller Zellen ist aus zwei komplementär zueinander liegenden Polynukleotidketten aufgebaut, wobei jede aus Nukleotiden besteht, welche über Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft sind. Jedes Nukleotid ist aus drei Teilen aufgebaut: dem Zucker Desoxyribose, Phosphorsäure und aus einer der vier Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin. Über die an den Nukleotiden sitzenden Basen sind die beiden Polynukleotidketten miteinander verknüpft. Guanin steht stets Cytosin gegenüber, die beiden Basen werden über drei Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten. Thymin und Adenin dagegen sind über eine zweifache Wasserstoffbrückenbindung miteinander verknüpft. Für das DNA-Molekül ergibt sich so die Form einer Doppelhelix (Watson und Crick 1953).

Mehrere Basenpaare bilden zusammen ein Gen. Jedes Gen enthält die Information zur Herstellung einer Ribonukleinsäure (RNA). Diese wiederum enthält die Information für den Bau der Proteine, die für die Entwicklung eines Lebewesens und den Zellstoffwechsel benötigt werden. Für jedes Lebewesen gibt es eine ganz bestimmte spezifische Abfolge der Basen, anhand

derer man umgekehrt jedes Lebewesen identifizieren kann (Voet et al. 2010).

Das Genom des *Homo sapiens* besteht zum Beispiel aus etwa 3,2 Milliarden Basenpaaren (Genome List), während die *E.coli*-Bakterien nur ein Genom von etwa 5,4 Millionen Basenpaaren besitzen (Genome List). Für die Pilzgruppe Ascomycetes wurde eine Genomgröße von etwa 35 Millionen Basenpaaren bestimmt (Genome List).

1.5.2 Alte DNA

Als alte DNA (aDNA) bezeichnet man die DNA einer Probe, die von einem toten Organismus stammt. Die Quelle der DNA kann dabei sehr unterschiedlich sein. So kann die aDNA beispielsweise aus alten Knochen, Koprolithen oder sogar aus Sedimenten (Hofreiter 2009) gewonnen werden. Hier handelt es sich meist um extrazelluläre DNA, die an die Sedimentpartikel gebunden ist.

In den letzten 30 Jahren, insbesondere jedoch in den letzten 15 Jahren hat die Untersuchung von aDNA aufgrund der weiteren Verbesserungen der Gentechnologie einen enormen Aufschwung erfahren (Rawlence et al. 2014). So untersucht man heutzutage aDNA unter forensischen, archäologischen, phylogenetischen, populationsgenetischen und paläoumweltgenetischen Aspekten (Hofreiter 2009).

Besonders das Gebiet der Paläoumweltgenetik gewinnt in der Klimaforschung immer größere Bedeutung. Für paläoumweltgenetische Analysen wird zunächst, vorrangig aus Sedimenten, aDNA gewonnen. Anhand der aDNA können dann wichtigste Bioindikatoren, zum Beispiel repräsentative Pflanzenarten, bestimmt werden. Anhand dieser lassen sich dann indirekt Rückschlüsse auf das Paläoklima und das Paläökosystem ziehen (Hofreiter 2009).

Die Arbeit mit alter DNA ist trotz der großartigen Entwicklungen der letzten Jahre nicht einfach. Das größte Problem stellt die DNA an sich da. Diese wird nämlich nach dem Absterben eines Organismus durch Bakterien, Pilze, Endonukleasen, Oxidationsreaktionen und hydrolytische Prozesse abgebaut. Normalerweise ist die DNA damit bereits nach kurzen Zeitabschnitten (wenige Monate oder Jahre) so weit abgebaut, dass sie sich nicht mehr analysieren lässt. Unter bestimmten Umweltbedingungen sind diese zersetzenden Prozesse jedoch verlangsamt. Die beste Erhaltung der DNA findet man im Permafrost, da dort nur sehr wenige DNA-abbauende Organismen vorhanden sind und auch die chemischen Abbauprozesse verlangsamt ablaufen. In Torfen aus Permafrostgebieten sind die Erhaltungsbedingungen sogar noch besser. Hier fehlt zusätzlich Sauerstoff, sodass die DNA nicht durch Oxidationsprozesse abgebaut werden kann. Man vermutet, dass die DNA unter idealen Bedingungen länger als eine Million Jahre amplifizierbar bleiben kann (Willerslev und Cooper 2005). Jede unter noch so guten Umweltbedingungen erhaltene aDNA ist trotz der günstigen Erhaltungsbedingungen stark geschädigt, d.h. dass die DNA in kleine DNA-Fragmente aufgespalten ist und durch chemische Reaktionen die Basenabfolgen verändert sein können. So wurde zum Beispiel festgestellt, dass sich die Pyrimidinbase Cytosin durch eine hydrolytische Deamidierung in Uracil und Thymin umwandeln kann (Willerslev und Cooper 2005).

Neben der teils schon stark angegriffen aDNA tritt bei der Analyse alter DNA noch ein weiteres Problem auf: die Probenmenge. Meist kann aus den Proben nur sehr wenig aDNA gewonnen werden. Zur Analyse muss diese deshalb mittels Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt werden. Wenn neben der Probe auch noch moderne DNA in die Reaktion gelangt, wird diese mitvervielfältigt. Da die moderne DNA besser erhalten ist und meist auch noch häufiger vorhanden, kann es ganz einfach passieren, dass das gesamte Ergebnis verfälscht wird. Um solche Verfälschungen zu vermeiden, muss daher in Laboren, die mit aDNA arbeiten, besonders gründlich auf die Sauberkeit geachtet werden.

2. Aufgabenstellung

In dieser Arbeit soll getestet werden, ob in den drei vorliegenden pleistozänen Torfproben von der Bolshoy Lyakhovsky Insel genügend gut erhaltene DNA vorhanden ist, welche man zu Analysezwecken heranziehen kann. Dazu soll versucht werden, die DNA mittels PCR und der Verwendung spezifischer Primer für Eukaryoten (Algen, Pilze, Moose, Gefäßpflanzen, Ringelwürmer und Säugetiere) zu vermehren.

Die Probe mit den besten PCR-Ergebnissen soll weiter charakterisiert werden. Hierzu sollen die PCR-Produkte des ersten Schrittes durch Klonierung voneinander getrennt und die einzelnen Sequenzen mittels einer Sangersequenzierung ermittelt werden. Die so gewonnenen Daten sollen mit verschiedenen Datenbanken abgeglichen werden, um eine möglichst genaue Bestimmung der enthaltenen Taxa zu erhalten.

Anschließend sollen die gefundenen Taxa mit denen einer Pollenanalyse der ausgewählten Probe verglichen werden. Mithilfe dieses Vergleichs sollen dann Rückschlüsse auf die Flora und Fauna im Spätpleistozän und damit auf die vorherrschenden Umweltbedingungen gezogen werden.

3. Material und Methoden

3.1 Herkunft der Proben

3.1.1 Die Bolshoy Lyakhovsky Insel



Abbildung 2: Lage der Bolshoy Lyakhovsky Insel und Ort der Probennahme (nach Wikipedia 2013).

Die in dieser Arbeit untersuchten Proben stammen von der Bolshoy Lyakhovsky Insel (Abbildung 2). Dies ist die südlichste der Neusibirischen Inseln. Sie liegt zwischen der Laptewsee (Laptev Sea) und der Ostsibirischen See (East Siberian Sea), die beide Randmeere des arktischen Ozeans sind.

Die Bolshoy Lyakhovsky Insel wurde bereits 1710 von Jakow Permyakow entdeckt und 1712 gemeinsam mit Mercuri Wagin auch zum ersten Mal erforscht. 1773 erkundete der Händler und Namensgeber für die Inseln, Iwan Ljachow, das Gebiet in der Hoffnung,

Mammutknochen und Elfenbein zu finden. Tatsächlich findet man bis heute hier und auf den Nachbarinseln Knochen von Mammuts, Nashörnern und Flusspferden sowie die dazugehörigen Zähne und Stoßzähne, die schon damals zur Verarbeitung in den Süden gebracht wurden (Whitley 1910). Außerdem findet man Überreste von Fell, Muskelgewebe und Blut ausgestorbener Tiere (DPA 2013).

Trotz der Nähe des Meeres ist das heutige Klima auf der Insel kontinental geprägt. Der jährliche Niederschlag beträgt 184 mm/Jahr, die mittlere Januartemperatur liegt bei -31°C und die mittlere Augusttemperatur bei +2,4 °C. Die Vegetation besteht aus arktischer Tundra. Die Landschaft zeichnet sich durch Eiskeilpolygone und intensives Torfwachstum aus (Meyer et al. 2002).

An der Südseite der Insel befinden sich Permafrostaufschlüsse mit gefrorenem Sediment, in welchem auch Fossilien aus dem Pleistozän enthalten sind. Diese Aufschlüsse wurden 1958 erstmals untersucht (Romanovsky NN. 1958). Sedimente auf der Bolshoy Lyakhovsky Insel wurden u.a. auch im Rahmen von russisch-deutschen Expeditionen des Alfred-Wegener-Instituts Potsdam 1999, 2007 und 2014 beprobt, untersucht und datiert. Alle Proben stammen aus dem Pleistozän. Neben Sedimentproben wurden bei der Expedition 2014 auch einige Torfproben geborgen (Schwamborn und Wetterich 2015). Sie haben eine Größe von ca. 15 cm x 25 cm x 10 cm und wurden seit der Probennahme 2014 gefroren bei - 20 °C gelagert. Man erhofft sich von ihnen Auskunft über die urzeitliche Flora und Fauna und damit über das Paläoökosystem und das Paläoklima. Dabei muss beachtet werden, dass das Untersuchungsgebiet während dieser Zeit keine Insel war. Während der Eiszeit war ein größerer Teil des Wassers als Eis gebunden und der Meeresspiegel zu dieser Zeit lag bis zu 125m tiefer als heute.

3.1.2 Die Beprobungsorte

3.1.2.1 Probe L14-11

Zwischen der Mündung des Flusses Zimov'e und dem Kap Kammenyi finden sich mehrere ähnliche Aufschlüsse an der Küste über eine Länge von 550 m. Über einer Sandschicht liegt hier eine ca. 1m dicke Torfschicht, welche mit Eislinsen und Eiskeilen durchsetzt ist. An der dem Wetter ausgesetzten Seite ist der Torf braun, im gefrorenen Inneren kann man grünes Moos erkennen. Die Schicht wurde in einer früheren Arbeit dem Yukagir Eiskomplex zugeordnet (Schirrmeister et al., 2002). Die hier untersuchte Probe stammt aus einem Aufschluss aus ca. 3,5m Höhe.



Abbildung 3: Aufschlussverhältnisse der Probe L14-11 (Schwamborn und Wetterich 2015)

3.1.2.2 Probe L14-10

Probe L14_10 stammt aus einem Aufschluss an der Küste ca. 1km westlich der Mündung des Zimov'e und wurde wie Probe L14-11 dem Yukagir-Eiskomplex zugeordnet (Schwamborn und Wetterich 2015). Das Erscheinungsbild des Moostorfes ähnelt dem der Probe L14-11.



Abbildung 4: Aufschlussverhältnisse der Probe L14-10 (Schwamborn und Wetterich 2015)

3.1.2.3 Probe L14-07

Diese Probe stammt aus ca. 6,7m Höhe aus einem Aufschluss an der Küste direkt westlich der Mündung des Zimov'e (Abbildung 5). Auf beiden Seiten eines Eiskeils findet sich zwischen 6,00 m und 6,70 m Höhe brauner Torf (PG1). Das Innere des Torfes besteht aus einer grauen Matrix mit rötlichen Punkten und groben Pflanzenresten (Schwamborn und Wetterich 2015). An dieser Stelle wurden schon 2007 Proben geborgen und dem Sartan-Eiskomplex zugeordnet (Wetterich et al. 2011).

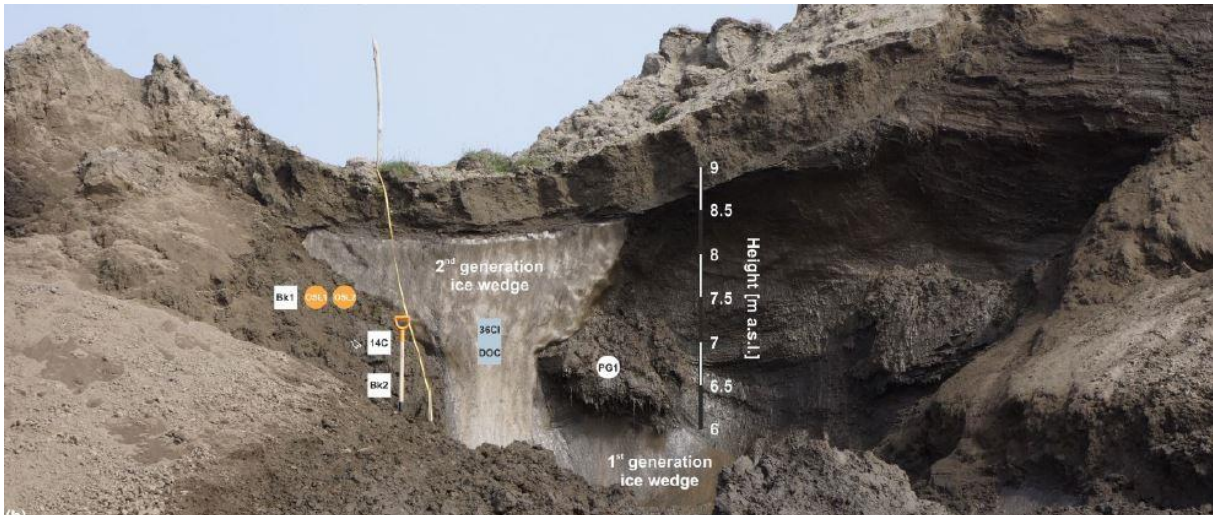


Abbildung 5: Aufschlussverhältnisse der Probe L14-07 (Schwamborn und Wetterich 2015)

3.2 Methoden

Zunächst wurden aus jeder Probe in der Klimakammer zwei Subproben ausgebohrt (Kapitel 3.2.1.2). Aus diesen wurde die DNA extrahiert (Kapitel 3.2.2). Anschließend wurde die DNA mittels PCR auf Pilze, Pflanzen, Moose, Diatomeen, Würmer und Säugetiere getestet und vermehrt (Kapitel 3.2.3.2). Der Nachweis erfolgte mittels Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.4).

Für die Probe aus der Sartan-Eiszeit wurde jede Abteilung (Pflanzen, Moose, Pilze, Diatomeen) bzw. jeden Stamm (Würmer, Säugetiere) anschließend noch weiter in individuelle Taxa aufgegliedert. Dazu wurde eine Klonierung (Kapitel 3.2.6) durchgeführt. Eine Sequenzierung (Kapitel 3.2.7) lieferte anschließend die genaue Basenabfolge der DNA. Schließlich wurden die Ergebnisse der Sequenzierung mit verschiedenen Gendatenbanken verglichen, um die genauen Taxa zu bestimmen (Kapitel 3.2.8). Anschließend wurden die bestimmten Taxa mit der Pollenanalyse (Kapitel 3.2.9) verglichen und Aussagen zur Paläoumwelt getroffen.

Die einzelnen Arbeitsschritte werden im Folgenden beschrieben.

3.2.1 Subbeprobung in der Klimakammer

3.2.1.1 Vorbereitungen

Alle Oberflächen der Klimakammer wurden zunächst gründlich mit VE-Wasser, Deconex und DNA-Exitus Plus gereinigt. Danach wurde die Klimakammer auf -10 °C heruntergekühlt. Vor und nach jeder Probennahme wurden alle Oberflächen mit Ethanol gereinigt.

Zur Reinigung wurden Lochsägen, Messer und Skalpellhalter zunächst in Wasser vorgespült. Die vorgespülten Instrumente wurden anschließend in einer Deconexlösung mit einer Zahnbürste gereinigt und in DNA-AWAY geschwenkt. Nach der Waschprozedur wurden die Gegenstände an der Luft getrocknet, bevor sie im UV-Crosslinker für 20 min bestrahlt wurden. Die Lochsägen wurden dabei so aufgestellt, dass die Öffnung nach oben zeigte. Die Messer wurden von beiden Seiten je 20 min bestrahlt. Die fertig bestrahlten Utensilien wurden bis zu ihrer Benutzung gut in mit UV-Licht bestrahlte Alufolie und in bestrahlte Plastiktüten verpackt.

Die Zugmesser wurden nacheinander mit Leitungswasser abgewaschen und mit einer Spülbürste mit Deconex abgebürstet. Im nächsten Schritt wurden sie mit VE-Wasser abgespült und danach mit DNA-Exitus Plus abgewischt. Zum Schluss wurden die Zugmesser nochmals mit VE-Wasser und anschließend mit Ethanol abgespült und abschließend das Ethanol abgeflammt. Die Zugmesser wurden bis zur Verwendung in Plastiktüten gelagert.

3.2.1.2 Durchführung der Subbeprobung

Die jeweils zu untersuchende Probe wurde aus der Kühlbox entnommen und auf einem Stück Alufolie für fünf Minuten vor die Klimakammer zum Antauen gelegt. In dieser Zeit wurde die Arbeitsfläche mit Ethanol gereinigt und die Befestigungsvorrichtungen für die Bohrproben vorbereitet. Im ersten Schritt wurde dann mit einem Zugmesser die oberste Schicht der Probe abgetragen und verworfen. Mit einem gereinigten Messer wurde eine weitere Schicht abgezogen und ebenfalls verworfen. Anschließend wurde die Probe am Bohrplatz fixiert. Mit einer unbenutzten, gereinigten Lochsäge wurde ein senkrechtes Loch durch die Probe gebohrt. Die ausgebohrte Subprobe für die DNA-Analyse wurde in eine saubere Alufolie verpackt. Mit demselben Bohrer wurde eine zweite Subprobe für die Pollenanalyse ausgebohrt und ebenfalls verpackt. Die Ausgangprobe wurde zur weiteren Aufbewahrung fachgerecht verpackt.

Alle benutzten Utensilien und andere möglicherweise durch Bohrstaub kontaminierten Gegenstände wurden nach jeder Probennahme entweder mit Ethanol gereinigt oder aus der Klimakammer entfernt.

Am Ende der Probennahmen wurden alle DNA-Proben auf 10^{-4} g genau gewogen und mit einem Lineal Länge und Durchmesser der Probe gemessen. Anschließend wurden mit einem abgeflammt und sterilen Messer beide Enden gekappt. Die beschrifteten DNA-Proben wurden in Probenröhrchen verschlossen und eingefroren gelagert. Die Pollenproben wurden ebenfalls gewogen und gemessen und in Whirlpaks verpackt.



Abbildung 6: Probe L14_07 vor und nach der Subbeprobung.

Von jedem Probenort wurden je drei Subproben für die DNA-Analyse und die Pollenanalyse ausgebohrt. Diese wurden nach folgendem Schema benannt: L14-Probenort_(1-9).

3.2.2 Extraktion der DNA

Die DNA-Extraktionen aus den in der Subbeprobung gewonnenen Proben wurden von Heike Zimmermann (AWI) und Janine Klimke (AWI) mit dem PowerMax Soil DNA Isolation Kit + prot K. + DTT durchgeführt.

3.2.3 PCR

Mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) kann man DNA außerhalb eines Organismus vervielfältigen (Mullis und Faloona 1987). Zunächst wird die zu vervielfältigende DNA mit freien Nukleotiden (dNTPs), DNA-Polymerase, Puffer, Magnesiumsulfat und speziellen Primern in einem Reaktionsgefäß zusammengebracht. Der PCR-Ansatz wird in einen Thermocycler gestellt, wo die eigentliche Reaktion abläuft. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird die DNA durch Erhitzen auf ca. 90° C in ihre beiden Einzelstränge aufgespalten. Nach der Denaturierung erfolgt die Hybridisierung. In diesem Schritt wird bei etwa 55° C an jeden Strang der Ausgangs-DNA ein Primer angelagert. Primer sind kurze DNA-Stücke, die sich an spezifische Abschnitte der DNA binden und so den Startpunkt für die Reaktion bilden. Nun erfolgt die Polymerisation bei etwa 72° C. Hierbei lagern sich die Nukleotide aus dem Ansatz an die zu vervielfältigende DNA an und werden dann von der Polymerase in 3'→5' Richtung miteinander verknüpft. Daher benötigt man jeweils ein Primerpaar, damit beide Stränge vervielfältigt werden können. Aus jedem Einzelstrang entsteht so ein neuer ein DNA-Doppelstrang. Am Ende dieses Schrittes hat man doppelt so viel DNA wie zu Beginn der PCR. Da eine einfache Verdopplung der DNA nicht ausreicht, um genügend Material zu erhalten, führt man die Schritte Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation mehrfach hintereinander aus, meist 20-30 mal. Für Proben mit besonders wenig genetischem Ausgangsmaterial, wie im Falle von aDNA, lässt man bis zu 50 Zyklen laufen.

3.2.3.1 Wahl der genetischen Primer

Die Wahl eines geeigneten Markers und eines entsprechenden Primers sind von essentieller Bedeutung für den Erfolg einer PCR mit aDNA. Als Marker muss man im Genom der zu untersuchenden Gruppe einen Bereich auswählen, welcher für alle Arten der zu identifizierbaren Gruppe identisch ist, sich jedoch von den DNA-Sequenzen anderer Gruppen unterscheidet. Dieser Marker sollte zwischen zwei hochgradig konservierten DNA-Bereichen liegen, an welche der Primer binden kann. Der Primer muss spezifisch für den gewählten Marker sein. Schließlich sollten wegen der Kürze der erhaltenen aDNA sowohl der Marker als auch der Primer kurz sein (Epp et al. 2012).

Während jede Zelle nur einen Zellkern mit einem einzigen DNA-Molekül besitzt, findet man pro Zelle im Mittel ca. 1000 Mitochondrien bzw. ca. 50 Chloroplasten, die jeweils mehrere DNA-Moleküle enthalten (Czihak et al. 1978). DNA aus Mitochondrien, Chloroplasten oder anderen Plastiden liegt daher in wesentlich größerer Zahl vor als Kern-DNA. Bei der Auswahl einer Markerregion bzw. beim Design eines Primers für aDNA ist es daher meist vorteilhaft, mit solcher extranuklearen DNA zu arbeiten. Zum Nachweis von Moosen hat sich beispielsweise das trnL (UAA) Intron der Chloroplasten als Marker bewährt (Taberlet et al. 2007; Epp et al. 2012). Als Marker für Würmer verwendet man

erfolgreich einen Abschnitt auf dem mitochondrialen 12S-rRNA-Gen (Epp et al. 2012). Säugetiere können anhand der mitochondrialen 16S rRNA-Gensequenz (Taylor 1996) nachgewiesen werden.

Fast alle hier verwendeten Primer binden an extranukleare DNA und wurden bereits erfolgreich an sedimentärer aDNA getestet. Sie sind in Tabelle 5 aufgeführt.

3.2.3.2 Initiale PCRs

Alle initialen PCR-Reaktionen wurden nach dem gleichen Muster ausgeführt. Unter einer UV-Arbeitsbank wurde zunächst der Mastermix (Tabelle 3) zusammenpipettiert und gut durchmischt. Je nachdem, welche Organismengruppe nachgewiesen werden sollte, wurden verschiedene Primer (Tabelle 5) verwendet. Aus Forward- und Reverseprimer wurde zunächst jeweils ein Primermix im Verhältnis 1:1 hergestellt und zur Herstellung des Mastermixes verwendet.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Mastermix

Chemikalie	Menge (µl)
H ₂ O	14,75
10X (UV)	2,5
dNTPs (2,5 mM)	2,5
BSA (UV, 20mg/ml)	1
MgSO ₄ (UV, 50mM)	1
Primermix (10µM)	1
HiFi (5U/ul)	0,25
DNA	3
<i>Total</i>	<i>26</i>

Der Mastermix wurde anschließend auf DNA-freie 0,5 ml Tubes verteilt und je 3 µl Proben-DNA hinzugegeben. Die Proben wurden zentrifugiert und anschließend in den Thermocycler gestellt. Für alle PCRs wurde das gleiche Cyclerprogramm verwendet (Tabelle 4). Die Annealing-Temperatur wurde bei jedem Experiment den verwendeten Primern angepasst (Tabelle 6). Die fertigen PCR-Produkte wurden anschließend entweder direkt weiterverwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

Bei der Untersuchung der Mammalia-DNA wurden zusätzliche Maßnahmen gegen moderne Kontamination getroffen. So wurde neben dem Mammaliaprimer auch der Blockingprimer 16Smam_blkhum3 (Boessenkool et al. 2012)

zugewetzt, welcher die Amplifikation von Human-DNA verhindert (Tabelle 19). Außerdem wurde besonders sauber gearbeitet und zusätzlich zu Kittel, Handschuhen und Armstulpen eine OP-Haube und ein Mundschutz getragen.

Tabelle 4: Cyclerprogramm der initialen PCRs.

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94	5 Minuten	1x
Denaturierung	94	30 Sekunden	
Annealing	49-60 (Tabelle 6)	30 Sekunden	50x
Elongation	68	30 Sekunden	
Finale Elongation	72	10 Minuten	1x

Tabelle 5: Verwendete Primer.

Taxon	Primer	Abkürzung	Primersequenz	DNA	Genomregion	Ampliconlänge [bp] (ohne Primer)	Quelle
Laubmoose	Bryo_P6F Bryo_P6R	bryo	GATTCAGGGAACTTAGGTTG CCATTGAGTCTCTGCACC	cpDNA	trnL P6_loop	ca. 50	Epp et al. 2012
Ringelwürmer	Ench_12Sa Ench_12Sc	ench	GCTGCACTTTGACTTGAC AGCCTGTGTACTGCTGTC	mtDNA	12S	ca. 50	Epp et al. 2012
Pilze	ITS5 5.8S_fungi	fungi	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT	mtDNA	ITS1	ca. 150-300	White et al. 1990
Kieselalgen	rbcl_705F rbcl_808R	rbcl	AACAGGTGAAGTTAAAGGTTTCATAYTT TGTAACCCATAACTAAATCGATCAT	cpDNA	rbcl	120	Stoof-Leichsenring et al. 2012
Kieselalgen	Diat_V9_1380F Diat_V9_1510R	Diat_V9	CCCTGCCHTTTGTACACAC CCTTCYGCAGGTTACCTAC	ncDNA	V9	87-186	Amaral-Zettler et al. 2009
Säugetiere	16Smam_1 16Smam_2	mam	CGGTTGGGGTGACCTCGGA GCTGTTATCCCTAGGGTAACT	mtDNA	16S	ca. 90	Taylor 1996
Gefäßpflanzen	trnL_g trnL_h	trnL	GGGCAATCCTGAGCCAA CCATTGAGTCTCTGCACCTATC	cpDNA	trnL P6_loop	ca. 50	Taberlet et al. 2007

mtDNA: mitochondriale DNA; ncDNA: Kern-DNA, cpDNA : Chloroplasten-DNA

Tabelle 6: Annealingtemperaturen der Primer.

Primerpaar	Annealingtemperatur (°C)
Bryo_P6, Bryo_P6R	51
Ench_12Sa, Ench_12Sc	56
ITS5, 5.8S_fungi	55
rbcL_705F, rbcL_808R	49
Diat_psbc_F_new, Diat_psbc_R_new	57
Diat_V91380T, Diat_V9_1510R	54
16Smam_1, 16Smam_2	60

3.2.4 Gelelektrophorese

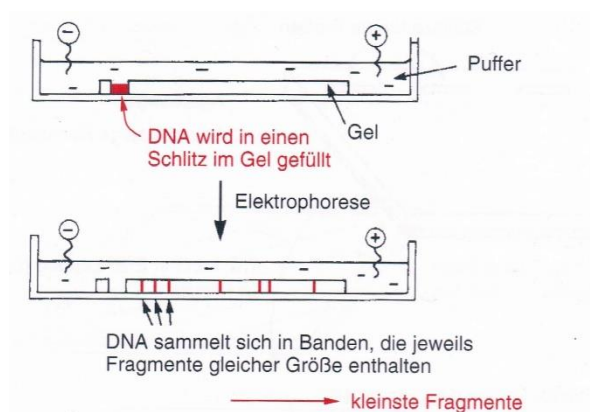


Abbildung 7: Prinzip der Gelelektrophorese (Brown 2007).

Die Gelelektrophorese ist eine Methode, um verschieden große DNA-Moleküle voneinander zu trennen.

DNA-Moleküle sind aufgrund ihres Phosphorrückgrates negativ geladen. Daher wandern sie in einem Gel zum positiven Pol. Je kleiner das DNA-Stück ist, desto schneller kann es sich durch das Gel bewegen. So kommt es zu einer Trennung der DNA-Stücke nach ihrer Länge. Um das Ergebnis der Elektrophorese sichtbar zu machen, ist das Gel mit einem Farbstoff versetzt, der sich in die DNA einlagert und unter UV-Licht leuchtet, sodass man auf dem Gel DNA-Banden erkennen kann. Um die absolute Größe der Proben-DNA zu bestimmen, lässt man neben den Proben noch einen Marker (Ladder) mitlaufen. Dieser enthält Moleküle mit genau bekannten Längen und kann so durch Vergleich zur Bestimmung der absoluten Größe benutzt werden.

Die absolute Größe der Proben-DNA zu bestimmen, lässt man neben den Proben noch einen Marker (Ladder) mitlaufen. Dieser enthält Moleküle mit genau bekannten Längen und kann so durch Vergleich zur Bestimmung der absoluten Größe benutzt werden.

3.2.4.1 Herstellung eines Elektrophoresegels

Ein Elektrophoresegel besteht aus Agarose, TAE-Puffer und einem Farbstoff, hier GelRed. Die benötigten Mengen ergeben sich aus der Zielkonzentration und der Größe des Gels.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Elektrophoresegele.

	Gel 1,5%	Gel 2%
Agarose	4,5 g	6 g
TAE-Puffer	300 ml	300 ml
GelRed	9 µl	9 µl

Nach dem Abwiegen gibt man die Agarose in ein hitzebeständiges Gefäß und fügt die richtige Menge an TAE-Puffer hinzu. Anschließend wird die Mischung in einer Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose komplett gelöst hat. Nun lässt man die Flüssigkeit auf ca. 60 °C abkühlen und gibt den Farbstoff GelRed hinzu. Das heiße Gel gießt man in die vorbereitete Form und lässt es dort erkalten.

3.2.4.2 Beladen des Gels und Durchführung der Elektrophorese

Zu je 3,5 µl Loading Dye wurden jeweils 3,5 µl der PCR-Produkte gegeben. Diese Mischungen wurden in die Taschen des Gels pipettiert, in weitere Taschen wurde 2,5 µl Orange Ruler 50 bp als Ladder pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde bei 75 V 70 min laufen gelassen. Bei den PCRs der Klonprodukte wurden die Laufbedingungen leicht variiert. Die Spannung lag im Bereich zwischen 75 V und 140 V, die Laufzeiten zwischen 40 und 70 Minuten. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

3.2.5 Aufreinigung

Bevor die Proben kloniert werden konnten, wurden sie aufgereinigt. Für die Aufreinigung wurden die Proben (ca. 20 µl) zuerst mit 100 µl PB-Puffer versetzt und dann resuspendiert. Die gesamte Flüssigkeit wurde danach vorsichtig auf eine Reinigungssäule (Qiagen MinElute PCR Purification kit) in einem Zentrifugenröhrchen gegeben und anschließend eine Minute bei 13000 g zentrifugiert. Die durch den Filter gelaufene Flüssigkeit wurde entsorgt. Auf die Reinigungssäule wurde nun 750 µl PE-Puffer gegeben. Dieser wurde ebenfalls durch die Reinigungssäule zentrifugiert (13000 g, 2 min). Nun wurden das Tube und die Reinigungssäule voneinander getrennt. Das Tube mit der Reinigungsflüssigkeit wurde entsorgt, während die Reinigungssäule in ein neues sauberes 1,5 ml Tube gestellt wurde. In die Reinigungssäule wurden nun 10 µl EB-Puffer gegeben und dann erneut eine Minute bei 13000 g zentrifugiert. Anschließend wurden erneut 10 µl EB-Puffer auf die Reinigungssäule gegeben und erneut zentrifugiert. Die Reinigungssäule wurde entsorgt. Die Flüssigkeit (ca. 20 µl) im Tube enthält die Proben-DNA.

Um zu testen, ob die Aufreinigung erfolgreich war, wurde mit den aufgereinigten Produkten eine Gelelektrophorese durchgeführt (Kapitel 4.3).

3.2.6 Klonierung

Mit einer Klonierung kann man die unterschiedlichen PCR-Produkte einer Probe voneinander trennen. Dies kann man nutzen, um Aufschluss über die in der Probe enthaltenen DNA-Sequenzen zu erhalten.

Zunächst wird die Proben-DNA auf Plasmide übertragen. Die DNA-Fragmente lagern sich dabei mit dem Plasmid zusammen und die Ligase verbindet die beiden Komponenten (Ligation). So entstehen rekombinante Plasmide, wobei jedes Plasmid genau ein DNA-Fragment enthält. Die Plasmide werden mithilfe eines Elektroschocks ins Innere eines Bakteriums geschleust (Transformation). Die Bakterien werden anschließend auf einem mit Antibiotika versetzten Nährboden ausplattiert, wo sie sich vermehren. Da dem Plasmid vor der Verwendung ein Gen mit Antibiotikaresistenz eingefügt wurde, können nur solche Bakterienstämme wachsen, die DNA aufgenommen haben.

Haben sich die Bakterien genügend vermehrt, können die Kolonien gepickt werden. Die Zellen der Klonkolonien werden denaturiert und die DNA mittels PCR nochmals vervielfältigt.

3.2.6.1 Durchführung

In dieser Arbeit wurden aufgrund der initialen PCRs sechs Proben ausgewählt (Kapitel 4.2) und kloniert. Vor der eigentlichen Klonierung wurde zunächst eine Taq-Inkubation durchgeführt, also an die PCR-Produkte eine Poly-A-Kette angehängt, um die Bindung an den Vektor zu ermöglichen. Für die Taq-Inkubation wurden 0,9 µl dNTPs, 0,1 µl Taq zu 5 µl des PCR-Produkts in ein kleines Probenröhrchen pipettiert und dieses im Thermocycler zehn Minuten auf 72°C erhitzt.

Die Proben wurden anschließend mittels des TOPO® TA® Cloning Kit for Sequencing kloniert. Zuerst wurde für die Ligation ein Mastermix aus 2 µl PCR-Produkt, 0,5 µl Salzlösung und 0,5 µl TOPO®- Vektor hergestellt. Außerdem musste für jedes PCR-Produkt ein Röhrchen mit 25 µl kompetenten *E. coli*-Zellen vorbereitet werden. Damit die Zellen ihre Kompetenz zur Aufnahme der Vektoren nicht verlieren, wurde auf Eis gearbeitet.

Nun wurde 3 µl des Mastermixes in die Röhrchen mit den *E. coli*-Zellen gegeben. Die gesamte Lösung wurde in eine GenePulser-Küvette pipettiert und anschließend die Vektoren mit der Proben-DNA über einen mit dem Micropulser erzeugten Elektroschock in die *E. coli*-Zellen eingeschleust. Anschließend wurde 125 µl SOC-Medium (37°C) in die Küvette gegeben und die Flüssigkeit einige Male auf und ab pipettiert, bevor die gesamte Flüssigkeit wieder in das Probenröhrchen der *E. coli*-Zellen pipettiert wurde.

Nachdem alle Proben transformiert waren, wurden die Proben bei 37 °C im Inkubator etwa eine Stunde lang bei 200 rpm geschüttelt. Nach Ablauf der Stunde wurden die Bakterien ausplattiert. Hierzu wurden je 50 µl der Zellen auf eine im Inkubator auf 37 °C vorgewärmte Nährmediumsplatte gegeben und mit einem Drigalskispatel gut verteilt. Anschließend wurden die Platten über Nacht in den 37 °C warmen Inkubator gestellt. Am nächsten Tag wurden die Klone gepickt. Hierzu wurde mit einer 10 µl Pipettenspitze jeweils eine Klonkolonie aus der Nährmediumsplatte gestochen und in ein Well einer 96er-Wellplatte gestellt, in welchem 30 µl DEPC-H₂O vorgelegt waren. Damit die Klone auch sicher in den Probenwells waren, wurde anschließend die Flüssigkeit in den Wells mehrfach auf und ab pipettiert. Nachdem alle Klone gepickt waren, wurden sie denaturiert. Dazu wurde die gesamte Platte in den Thermocycler gestellt und für 10 Minuten auf 94 °C erhitzt.

Nun erfolgte die Klon-PCR. Diese wurde analog zu initialen PCRs (Kapitel 3.2.3.2) durchgeführt. Dabei wurden folgende Chemikalien und Cyclerprogramme verwendet:

Tabelle 8: Cyclerprogramm für die Klon-PCR.

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94	5 Minuten	1x
Denaturierung	94	30 Sekunden	35x
Annealing	52	30 Sekunden	
Elongation	72	30 Sekunden	
Finale Elongation	72	10 Minuten	1x

Tabelle 9: Mastermix für die Klon-PCR.

	Ansatz 1	Ansatz 2
Chemikalie	Menge (µl)	Menge (µl)
H ₂ O	5,5	7,1
Qiagen Mastermix	7,5	-
T3	0,5	0,75
T7	0,5	0,75
Sigmapuffer	-	1,5
Sigma-Taq	-	0,15
DNA	1	4
<i>Summe</i>	<i>15</i>	<i>15</i>

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde eine Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.4) mit einem 1,5%-Gel durchgeführt.

3.2.7 Sequenzierung

Mittels einer Sequenzierung kann die genaue Basenabfolge der DNA bestimmt werden. Zur Bestimmung der Nukleotidabfolgen gibt es heutzutage unterschiedliche Verfahren, wobei in dieser Arbeit das Sangerverfahren (Sanger und Coulson 1975), auch Kettenabbruchmethode genannt, verwendet wurde.

Für die Sangersequenzierung wird die DNA zunächst denaturiert. Zu der denaturierten DNA wird anschließend ein Primer gegeben, welcher den Startpunkt der Replikation markiert. Für die Synthese wird die Lösung mit der Proben-DNA auf vier unterschiedliche Ansätze verteilt. Jeder Ansatz enthält dabei eine DNA-Polymerase, die vier Desoxynucleosidtriphosphate (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) und eines der vier Abbruchnukleotide. An diesen Abbruchnukleotiden fehlt die OH-Gruppe am dritten Kohlenstoffatom, weshalb keine weiteren Nukleotide mehr angeknüpft werden können. Bei der Synthese werden also in den vier Ansätzen alle möglichen unterschiedlich langen DNA-Fragmente erzeugt, die alle mit der Base des entsprechenden ansatzspezifischen Abbruchnukleotids aufhören. Nach der Synthese wird mit der denaturierten DNA aus den vier unterschiedlichen Ansätzen parallel eine Gelelektrophorese durchgeführt. Nun kann mittels des Elektrophoresebildes einfach die Sequenz bestimmt werden. Alternativ können die Sequenzen auch über Fluoreszenzsignale ermittelt werden.

Insgesamt wurden 96 Proben zur Sequenzierung an die Firma LGC Genomics (Berlin) geschickt, wo die Basenabfolge bestimmt wurde. Dabei handelte es sich um je 16 Proben der sechs klonierten PCR-Produkte.

3.2.8 Sequenzanalyse

Die Daten aus der Sangersequenzierung wurden zuerst mittels des Computerprogramms Geneious 7.1.9 ausgewertet. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

Die Sequenzen der eingeschickten Proben und der verwendeten Primer wurden in das Programm geladen. Zuerst wurde die Qualität der Daten analysiert. Alle Sequenzabfolgen, welche mehr als 70 % unsichere Fluoreszenzsignale enthielten, wurden aus der Auswertung herausgenommen (High

Quality (HQ) >30). Die übrigen Sequenzen wurden zugeschnitten. Dazu wurde in den Sequenzen zunächst der Primer gesucht und markiert. Nun wurde überprüft, ob Beginn und Ende der analysierten Sequenz den Primern entsprechen und ob die Länge der Sequenz zwischen dem Vorwärts- und dem Rückwärtsprimer zur Amplifikationslänge passt. Wenn das der Fall war, wurden die Primer von der Sequenz abgeschnitten.

Die zugeschnittenen Sequenzen wurden anschließend mit einer Blast-Search-Funktion (Basic Local Alignment Search Tool-Search-Funktion) in der nr-Datenbank von Geneious gesucht. Dabei wurden folgende Einstellungen verwendet:

Database: nr
Program: Megablast
Results: Hit Table
Retrieve: Matching region with annotations
Max. Hits: 50
Scoring (Match Mismatch): 1-2

Mithilfe der Suche wurde so für jede Sequenz eine Trefferliste mit 50 möglichen Taxa erstellt. Für den Gefäßpflanzenprimer, den Bryophytenprimer und den Pilzprimer wurden außer dem Abgleich mit der Geneious nr-Datenbank auch noch Abgleiche mit anderen spezifischeren Datenbanken durchgeführt. Die verwendeten Datenbanken waren für die Moose *byro_gh_ref* (Soininen et al. 2015), für die Gefäßpflanzen *references.arctic_gh* (Willerslev et al. 2014) und *references.boreal_gh* (Sønstebo et al. 2010). Für die Pilze wurde ein NCBI- Blast im Internet (Nucleotide BLAST) durchgeführt.

Die Ergebnisse der Sequenzsuche wurden ausgewertet, um jeder Probe ein Taxon zuzuordnen. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

Zuerst wurden die Ergebnisse der Sequenzsuche danach sortiert, wie gut sich die Probensequenzen mit den Sequenzen der Datenbank decken. Oft gab es aber mehrere Proben, welche gleich gute Werte besaßen. In solchen Fällen wurde dann danach geschaut, wie gut die Basen der Probensequenz mit der Datenbank übereinstimmen. Wenn es dann immer noch mehrere gleichwertige Ergebnisse gab, wurde wie folgt verfahren: Zunächst wurden Ordnung, Familie, Gattung und Art der verbliebenen möglichen Taxa bestimmt. Diese wurden dann miteinander verglichen und festgestellt, auf welcher taxonomischen Stufe sich die möglichen Taxa treffen. Die genaueste der übereinstimmenden Stufen wurde dann als taxonomische Zuordnung für die Probe gewählt.

3.2.9 Pollenanalyse

Die Pollen wurden von Elena Raschke (AWI) präpariert, am Mikroskop analysiert und gezählt. Grundsätzlich erfordert eine Pollenanalyse ein gutes Auge und lange Erfahrung.

4. Ergebnisse

4.1 Initiale PCRs

Insgesamt wurden 11 initiale PCRs durchgeführt und dabei sieben unterschiedliche Primer auf die Proben angewendet (Tabelle 10). Bei fast allen Versuchen gelang es dabei DNA zu amplifizieren und zu vervielfältigen, wie die Elektrophoresegele mit ihren DNA-Banden zeigen. Ausnahmen bildeten die Experimente ES002P, ES003P und ES004P. Hier konnte nur in wenigen Proben DNA nachgewiesen werden. Die gelungenen PCRs unterscheiden sich in der Menge der enthaltenen DNA. So konnte in den Proben des Torfes L14-07 in der Regel mehr DNA nachgewiesen werden als in den Torfproben L14-10 und L14-11.

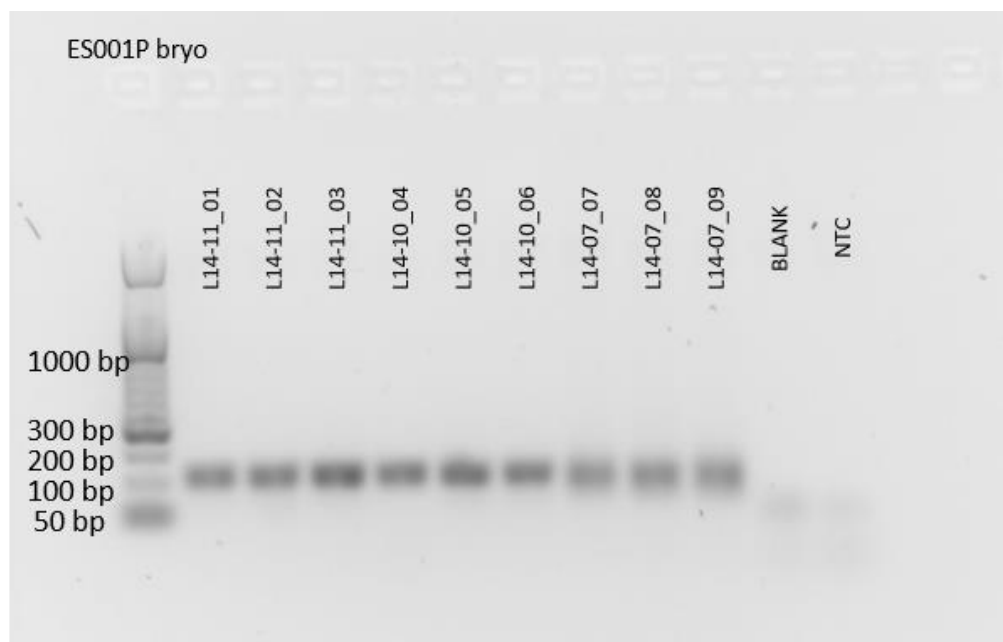


Abbildung 8: Gel der initialen PCR ES001P

Abbildung 8 zeigt das Gel des Versuchs ES001P, bei dem der Bryophytenprimer verwendet wurde. Alle neun Proben haben im Gel eine deutliche DNA-Bande von etwas mehr als 100 Basenpaaren gebildet. Das entspricht der erwarteten Länge für den hier verwendeten Bryophytenprimer (Tabelle 5). Wie erwünscht, sind in den Negativkontrollen (Blank, NTC) keine DNA-Banden zu sehen, was bedeutet, dass in diesen Proben keine DNA vorhanden ist.

Tabelle 10: Ergebnisse der initialen PCRs.

	Bryophyta (Bryophyten, Laubmoose)		Enchytraeidae (Enchiträen, Ringelwürmer)		Fungi (Pilze)		Diatomea (Diatomeen, Kieselalgen)			Tracheophyta (Gefäßpflanzen)	Mammalia (Säugetiere)
Primer Probe	Bryo (ES001P)	Bryo (ES002P)	Ench (ES003P)	Ench (ES004)	Fungi (ES005P)	Fungi (ES006P)	rbcL (ES011P)	diat_V9 (ES009P)	diat_V9 (ES012P)	trnL (HZ090P)	mam (ES010P)
L14-11_01	+	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	-
L14-11_02	+	(+)	-	-	+	+	+	+	+	+	+
L14-11_03	+	+	(+)	-	+	+	+	+	+	+	+
L14-10_04	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	(+)
L14-10_05	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
L14-10_06	+	-	-	(+)	+	+	(+)	+	+	+	+
L14-07_07	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
L14-07_08	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
L14-07_09	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
BLANK	-	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)	-	-
NTC	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Legende:

+ DNA-Bande
 (+) schwache DNA-Bande
 - keine Bande

grau unterlegt: klonierte Proben

4.2 Auswahl der PCR-Produkte

Da aus Zeit- und Kostengründen nicht alle Proben kloniert werden konnten, musste eine Auswahl getroffen werden. Es wurde beschlossen, die PCR-Produkte der Probe L14-07_07 von den Experimenten ES001P, ES003P, ES005P, ES010P, ES011P, ES012P und HZ090P zu klonieren, da die Ergebnisse dieser Proben in den initialen PCRs besonders gut waren (Tabelle 10). Außerdem wurde Probe ES012P ausgewählt, obwohl im Blank Verunreinigungen gefunden wurden. Daher wurde das Blank ebenfalls kloniert. Ein weiteres Kriterium für diese Wahl der Proben war, dass man die Daten der Klonierungssequenzen miteinander in Relation setzen kann, da die DNA aller Klone aus ein und derselben Subprobe stammen.

4.3 Aufreinigung

Bei den meisten Proben brachte die Aufreinigung der DNA das gewünschte Ergebnis. Das zeigt das Elektrophoresegel (Abbildung 9), bei dem die meisten der acht aufgereinigten Proben nur eine klare DNA-Bande der richtigen Länge (Tabelle 5) zeigen. Bei den Proben ES003P_7 und ES010P_7 zeigt sich neben der erwarteten DNA-Bande noch eine weitere Bande. Dabei ist die Bande der Probe ES010P_7 im Vergleich zur erwarteten DNA-Bande sehr schwach, während bei der Probe ES003P_7 die Deutlichkeit der unerwünschten zweiten Bande mindestens genauso gut ist wie die der erwünschten DNA-Bande. Daher

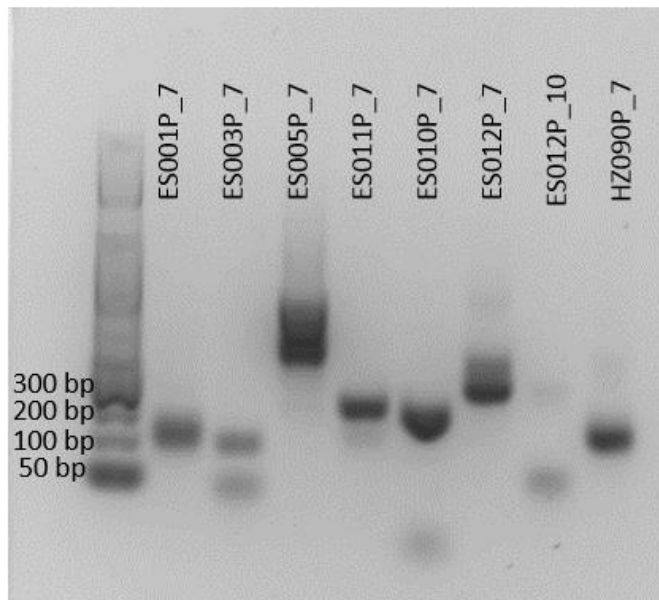


Abbildung 9: Gel der aufgereinigten PCR-Produkte.

wurde beschlossen, diese Probe nicht weiter zu verwenden, d.h. sie wurde nicht kloniert. Bei der Probe ES012P_10 handelt es sich um das positive Extraktionsblank. Die hier auftretende Verunreinigung im Bereich von 50 Basenpaaren ist in der Probe ES012P_7 nicht vorhanden. Die zweite schwache Bande des Extraktionsblanks (ES012P_10) liegt im Bereich der Bande von ES012P_7. Dabei handelt es sich vermutlich um die gleiche DNA wie in Probe ES012P_7, welche folglich ohne Bedenken weiter untersucht werden kann.

4.4 Ergebnisse der Sequenzanalyse

Von den 96 zur Sequenzierung eingeschickten Klonsequenzen lieferten 73 Daten einer zur weiteren Analyse nutzbaren Qualität (High Quality >30) (Tabelle 11, Tabelle 18).

Tabelle 11: Statistik zu den eingeschickten DNA-Sequenzen.

Primer	eingeschickte Sequenzen	Sequenzen brauchbarer Qualität	unterschiedliche Sequenzen	unterschiedliche Taxa
bryo	16	10	6	4
fungi	16	11	9	8
trnL	16	11	6	6
diat_V9	16	14	7	5
rbcl	16	15	7	4
mam	16	12	5	3
Summe	96	73	40	30

Tabelle 12: Länge der Sequenzen

Primer	Länge der Sequenzen (bp)
bryo	49 - 54
fungi	172 - 287
trnL	47 – 53
diat_V9	136 – 140
rbcl	76
mam	90 - 93

Die 73 zur Auswertung nutzbaren Sequenzen hatten nach dem Abtrennen des Primerpaars eine Länge zwischen 47 und 287 Basen (Tabelle 12), was in etwa den erwarteten Sequenzlängen entspricht (Tabelle 5).

Von den 73 nutzbaren Sequenzen waren einige Sequenzen identisch. Daher gab es insgesamt nur 40 unterschiedliche DNA-Sequenzen. Fast allen dieser DNA-Sequenzen konnte mithilfe der unterschiedlichen Datenbanken ein Taxon zugeordnet werden (Tabelle 13). Dabei kam es trotz der unterschiedlichen Sequenzen zu Dopplungen in den zugeordneten Taxa.

Insgesamt konnten daher nur 30 unterschiedliche Taxa gefunden werden. Bei zwei der Sequenzen (ES001P_7_15, HZ090P_7_1) konnte kein passendes Taxon gefunden werden. Es handelt sich bei diesen Proben vermutlich um unvollständige PCR-Produkte oder PCR-Artefakte.

Tabelle 13: Ergebnisse der Sequenzanalyse.

Primer	Proben	Finale taxonomische Zuordnung	Übereinstimmung mit der Referenz in %	Abdeckung Datenbank/Probe
Bryo	ES001P_7_1; ES001P_7_4	Bryaceae sp.	100,0%	92,6%
Bryo	ES001P_7_2	Polytrichaceae sp.	100,0%	91,8%
Bryo	ES001P_7_6; ES001P_7_11; ES001P_7_16	<i>Tortula sp.</i>	97,9%	92,2%
Bryo	ES001P_7_7	Polytrichaceae sp.	100,0%	91,8%
Bryo	ES001P_7_10; ES001P_7_14	Dicanales sp.	93,3%	91,8%
Bryo	ES001P_7_15	kein Treffer	0,0%	0,0%
Fungi	ES005P_9_1	<i>Psathyrella sp.</i>	98,2%	100,0%
Fungi	ES005P_9_2	Ascomycota sp.	89,0%	92,0%
Fungi	ES005P_9_3	Pezizomycotina sp.	93,0%	100,0%
Fungi	ES005P_9_5	Helotiales sp.	97,0%	100,0%
Fungi	ES005P_9_7; ES005P_9_12	<i>Conocybe sp.</i>	95,0%	100,0%
Fungi	ES005P_9_8	Auriculariales sp.	77,0%	100,0%
Fungi	ES005P_9_9	<i>Mortierella sp.</i>	96,0%	100,0%
Fungi	ES005P_9_14; ES005P_9_15	<i>Ophiosphaerella sp.</i>	98,0%	100,0%
Fungi	ES005P_9_16	<i>Conocybe sp.</i>	94,0%	100,0%
rbcL	ES011P_7_1; ES011P_7_5	<i>Hantzschia amphioxys</i>	97,4%	100,0%
rbcL	ES011P_7_2	Bacillariophylaceae sp.	90,8%	100,0%
rbcL	ES011P_7_3; ES011P_7_4; ES011P_7_6; ES011P_7_7; ES011P_7_11; ES011P_7_12; ES011P_7_13; ES011P_7_14	<i>Mayamaea sp.</i>	96,1%	100,0%
rbcL	ES011P_7_8	<i>Pinnularia sp.</i>	94,7%	100,0%
rbcL	ES011P_7_9	<i>Mayamaea atomus</i>	92,1%	100,0%
rbcL	ES011P_7_10	<i>Mayamaea sp.</i>	93,4%	100,0%
rbcL	ES011P_7_15	<i>Hantzschia amphioxys</i>	96,1%	100,0%

Diat_V9	ES012P_7_3	<i>Pseudo-nitzschia sp.</i>	96,4%	100,0%
Diat_V9	ES012P_7_4; ES012P_7_10	<i>Pratylenchus ritteri</i>	100,0%	100,0%
Diat_V9	ES012P_7_1; ES012P_7_12	Poaceae sp.	100,0%	100,0%
Diat_V9	ES012P_7_6; ES012P_7_9; ES012P_7_11; ES012P_7_13; ES012P_7_15; ES012P_7_16	Poaceae sp.	100,0%	100,0%
Diat_V9	ES012P_7_7	<i>Pungentus sp.</i>	100,0%	100,0%
Diat_V9	ES012P_7_8	<i>Pungentus sp.</i>	97,8%	100,0%
Diat_V9	ES012P_7_14	<i>Allodorylaimus sp.</i>	97,8%	100,0%
trnL	HZ090P_7_1	<i>Beggiatoa</i> → keine Gefäßpflanze, vermutl. Artefakt	99,1%	87,8%
trnL	HZ090P_7_2; HZ090P_7_4; HZ090P_7_6; HZ090P_7_7; HZ090P_7_10	Pooideae Group 1	100,0%	100,0%
trnL	HZ090P_7_8; HZ090P_7_14	Anthemideae Group 1	100,0%	100,0%
trnL	HZ090P_7_12	<i>Potentilla</i> Group 1 Group 2	100,0%	100,0%
trnL	HZ090P_7_13	<i>Salix</i> Group 1	100.0%	100.00%
trnL	HZ090P_7_15	<i>Parrya</i> Group 1	100,0%	100,0%
Mam	ES010P_7_1; ES010P_7_8; ES010P_7_13	<i>Mammuthus sp.</i>	100,0%	100,0%
Mam	ES010P_7_4	Muroidea sp.	94,3%	97,8%
Mam	ES010P_7_5; ES010P_7_7; ES010P_7_9; ES010P_7_10; ES010P_7_11; ES010P_7_15	<i>Mammuthus sp.</i>	100,0%	100,0%
Mam	ES010P_7_12	<i>Rangifer sp.</i>	95,7%	100,0%
Mam	ES010P_7_16	<i>Mammuthus sp.</i>	100,0%	100,0%

Bei den Laubmoosen wurden fünf unterschiedliche nutzbare Sequenzen gefunden, welche sich mittels der Datenbank vier unterschiedlichen Taxa zuordnen ließen. Die meisten der Sequenzen (33%) konnten der Gattung *Tortula* zugeordnet werden. Je 22% der Sequenzen wurden *Bryaceae* sp., *Dicranales* sp. und *Polytrichaceae* sp. zugeordnet. Bei den *Polytrichaceae* setzten sich die 22% aus zwei unterschiedlichen Sequenzen zusammen (diese sind in der Abbildung 10 mit unterschiedlichen Grüntönen gekennzeichnet).

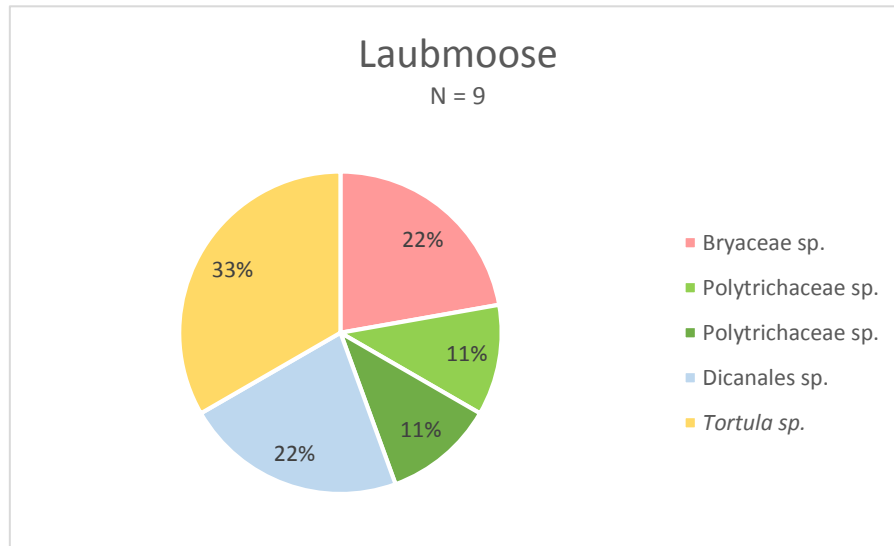


Abbildung 10: Taxa Laubmoose.

Der Pilzprimer lieferte neun unterschiedliche Sequenzen. Diese konnten acht unterschiedlichen Pilztaxa zugeordnet werden. Den größten Anteil hat mit insgesamt 27% *Conocybe* sp.. Die 27 % verteilen sich dabei auf zwei unterschiedliche Sequenzen, wobei die eine Sequenz einen Anteil von 18% der ausgewerteten Pilzsequenzen hat und die andere Sequenz einen Anteil von 9% der ausgewerteten Pilzsequenzen. Den zweitgrößten Anteil unter den gefundenen Pilzen hat *Ophiosphaerella* sp. mit 18%. Alle anderen Pilze (*Psathyrella* sp., *Ascomycota* sp., *Pezizomycotina* sp., *Helotiales* sp., *Auriculariales* sp. *Mortierella* sp.) haben einen Anteil von 9%

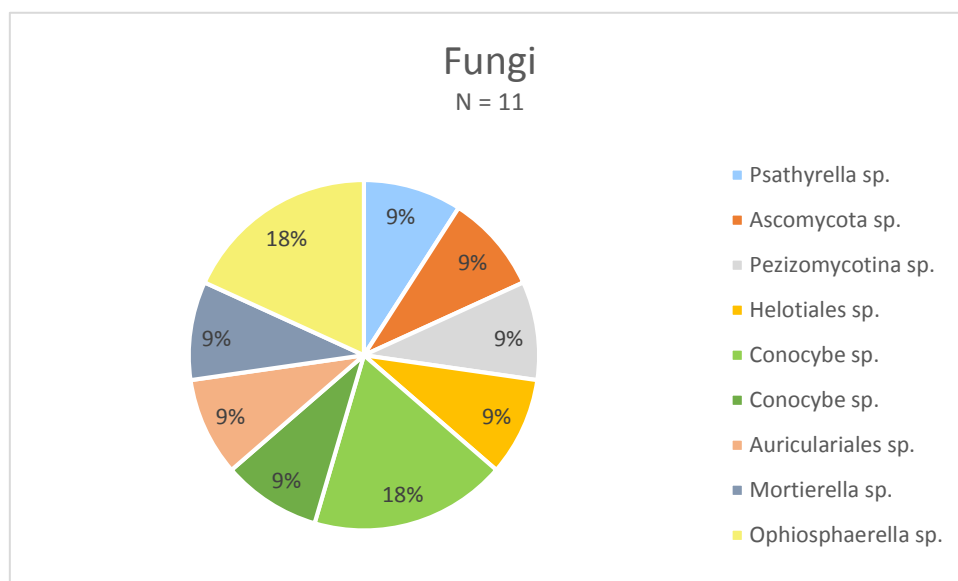


Abbildung 11: Taxa Pilze.

Für die Kieselalgen konnten vier unterschiedliche Gattungen bestimmt werden. Die häufigste Gattung war dabei *Mayamaea*. Sie wurde drei unterschiedlichen Sequenzen zugeordnet, die zusammen einen Anteil von 67% der mit dem Diatomeenprimer analysierten DNA ausmachen. Die am zweithäufigsten gefundene Gattung unter den Diatomeen war *Hantzschia*. Hier war sogar in beiden Fällen die genaue Bestimmung der Art möglich. Beide Sequenzen konnten der Art *Hantzschia amphioxys* zugeordnet werden. Neben den schon genannten Gattungen wurden auch *Bacillariophylaceae* sp. und *Pinnularia* sp. in der Probe gefunden.

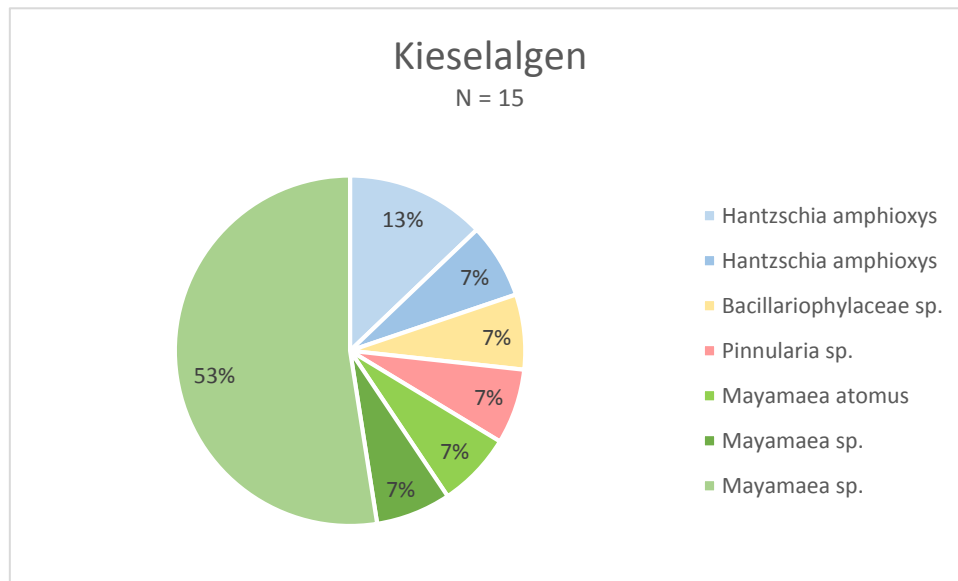


Abbildung 12: Taxa Kieselalgen.

Der Primer Diat_V9 liefert Ergebnisse für unterschiedliche Eukaryotengruppen. Hier konnten sieben unterschiedliche Sequenzen gefunden werden. Die meisten Sequenzen (57%) konnten der Familie der Poaceae aus der Gruppe der Gefäßpflanzen zugeordnet werden, wobei es hier zwei unterschiedliche Basenabfolgen gab. Nach den Gefäßpflanzen folgen anteilmäßig die Fadenwürmer (Nematoden). Auf *Pratylenchus ritteri* und *Pungentus* sp. entfallen je 14% der gefundenen Basenabfolgen. Dabei wurden für *Pungentus* sp. zwei unterschiedliche Sequenzen mit Anteilen von je 7% der Sequenzen gefunden. Ebenfalls 7% der Sequenzen entfallen auf die Nematode *Allodorylaimus* sp., sowie auf die Diatomee *Pseudo-nitzschia* sp..

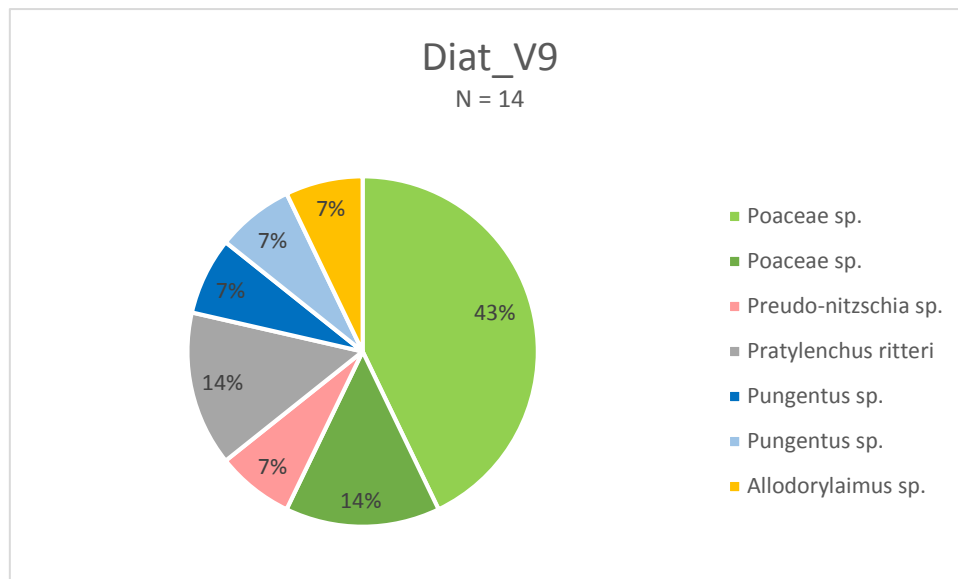


Abbildung 13: Taxa Diat_V9.

Der Gefäßpflanzenprimer trnL lieferte fünf verschiedene Taxa. Den größten Anteil haben mit 45% der nutzbaren Sequenzen die Pooideae der Gruppe 1 (Stipeae, Poeae), gefolgt von den Sequenzen der Anthemideae Gruppe 1 (*Artemisia*, *Achillea*, *Chrysanthemum Chrysanthemum*, *Tanacetum*) mit 18% der analysierten Sequenzen. Je 9% der Sequenzen konnten den Gruppen *Potentilla* Gruppe 1 Gruppe 2 (Sønstebo et al. 2010), *Salix* Gruppe 1 (Sønstebo et al. 2010) und *Parrya* Gruppe 1 (Sønstebo et al. 2010) zugeordnet werden.

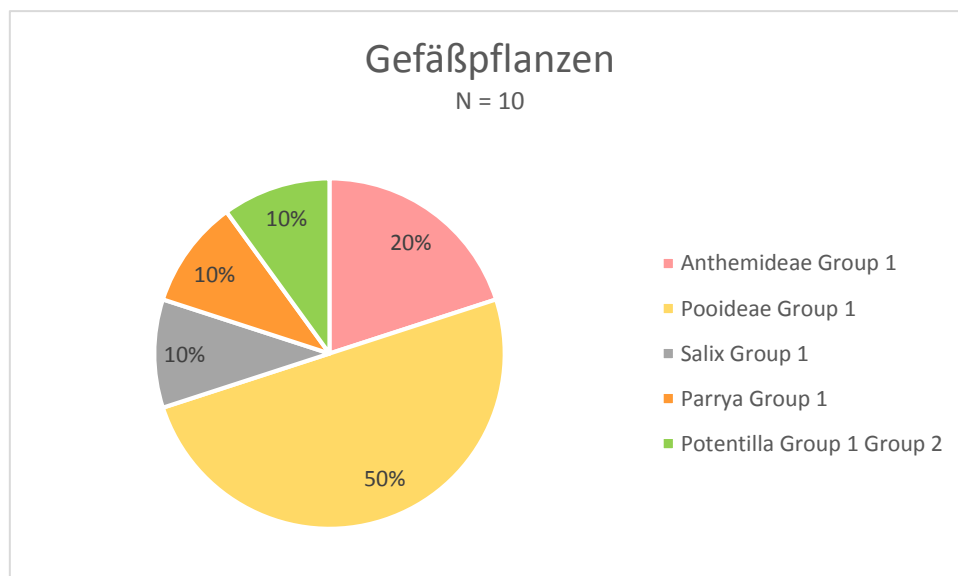


Abbildung 14: Taxa Gefäßpflanzen.

Bei der Analyse der Säugetiersequenzen wurden fünf unterschiedliche Basenabfolgen gefunden. Drei davon wurden *Mammuthus sp.* zugeordnet. Zusammen haben diese drei Sequenzen in den Mammaliasequenzen einen Anteil von 83%. Die beiden anderen Sequenzen wurden jede nur einmal gefunden (Anteil je 8%). Sie wurden *Muroidea sp.* (Mäuseartige) und *Rangifer sp.* (Ren) zugeordnet.

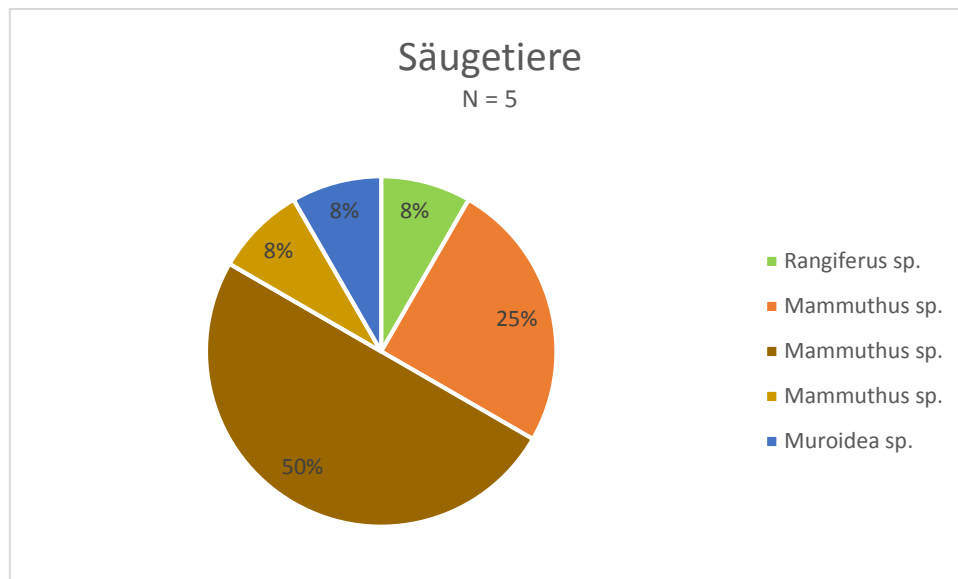


Abbildung 15: Taxa Säugetiere.

4.5 Ergebnisse der Pollenanalyse

Insgesamt wurden in der Probe L14-07 534 Pollen und 53 nicht Pollen Palynomorphe (NPPs) gezählt. Damit enthält die Probe einen Pollenanteil von ca. 91%. Die Pollen und NPPs wurden 39 verschiedenen Taxa zugeordnet. Einige Pollen und NPPs sind in Abbildung 16 dargestellt. Alle gefundenen Pollen und NPPs sind in Tabelle 14 aufgeführt.

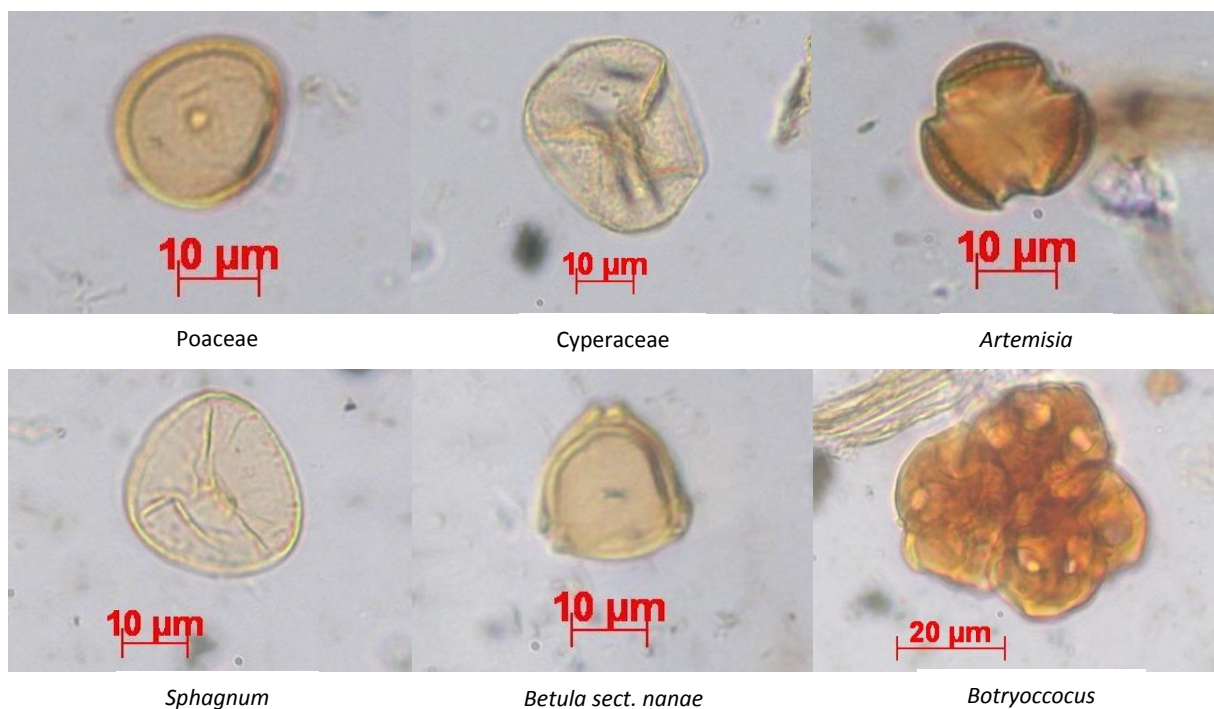


Abbildung 16: einige gefundene Pollen und NPPs.

Tabelle 14: Ergebnisse der Pollenanalyse.

Code	Taxa	Gruppe	Häufigkeit
AlnFrutT	<i>Alnus fruticosa</i> -type	A	3
b.nana	<i>Betula</i> sect. <i>Nanae</i>	A	11
larix	<i>Larix</i>	A	2
PinCembT	Pinus s/g Haploxyton-type	A	9
Picea	<i>Picea</i>	A	1
Salix	<i>Salix</i>	A	4
Artemisi	<i>Artemisia</i>	B	31
AsterT	Asteraceae	B	3
brass	Brassicaceae	B	3
desc	cf. <i>Descurainia</i>	B	2
Caryoph.	Caryophyllaceae	B	8
Cichor.	Cichoriaceae (Taraxacum-type)	B	1
Cyperac.	Cyperaceae	B	49
dryas	cf. <i>Dryas</i>	B	2
Ericac.	Ericales	B	1
inder	Indeterminata	B	3
pap	Papaveraceae	B	1
myos	cf. <i>Myositis</i>	B	1
poa	Poaceae	B	377
polem	<i>Polemonium</i>	B	1
ranu	Ranunculaceae	B	3
potent	<i>Potentilla</i> sp.	B	8
plant	cf. <i>Plantago</i>	B	1
Rumex	<i>Rumex/Oxyria</i>	B	1
Saxifrag	<i>Saxifraga</i>	B	8
bryal	Bryales	C	8
equi	<i>Equisetum</i>	C	1
l.anno	<i>Lycopodium annotinum</i> -type	C	1
polypod.	Polypodiaceae	C	4
ricc	<i>Riccia</i>	C	2
Selagroup	Selaginella rupestris	C	3
Sphagnum	<i>Sphagnum</i>	C	5
cercor	<i>Cercophora</i>	D	1
sordaria	<i>Sordaria</i>	D	2
spor	<i>Sporormiella</i>	D	5
zygnema	<i>Zygnema</i> -type	E	9
redeposi	Prequaternary spores	F	1
pediastr	<i>Pediastrum</i>	E	6
botr	<i>Botryococcus</i>	E	5
Standard	Lycopodium spore	zugesetzt	99

Gruppen:

A = Bäume und Sträucher, B = krautartige Pflanzen, C = Sporen, D = Pilze, E = Algen, F = Prequaternary

Tabelle 15: Häufige Pollentaxa.

Taxa	Häufigkeit
Poaceae	337
Cyperaceae	49
Artemisia	31
Betula sect. Nanae	11
Zygnema-type	9
p.s/g Haploxylon-type	9
Bryales	8
Saxifraga	8
Potentilla sp.	8
Caryophyllaceae	8
Summe	486

Bei Betrachtung der Tabelle der Pollenanalyse fallen einige dominante Taxa auf (Tabelle 15). So wurden 337 Poaceaepollen gefunden und 49 Cyperaceapollen. Nach den Poaceae und den Cyperaceae haben Artemisia (31 Pollen) und *Betula sect. nanae* (11 Pollen) die größte Häufigkeit. Die Pollen des *Zygnema*-Typs und des Haploxylon-Typs wurden je neun Mal gefunden. Ebenfalls häufig (je 8 Pollen) wurden Pollen von Bryales, *Saxifraga*, *Potentilla* und Caryophyllaceae gefunden.

Anteile der Pflanzentypen in den Pollen

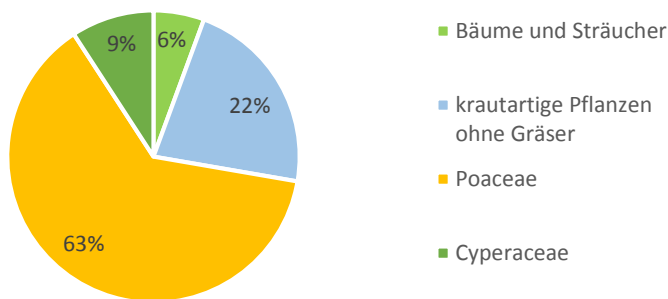


Abbildung 17: Anteile der Pflanzentypen in den Pollen.

Neben der absoluten Häufigkeit wurden die Anteile der verschiedenen Pflanzentypen bestimmt. Den größten Anteil haben mit 63% die Poaceae. Den zweitgrößten Anteil nehmen die krautartigen Pflanzen mit 22% ein, gefolgt von den Cyperaceae mit 9%. Bäume und Sträucher haben mit 6% in der Probe den kleinsten Anteil (Abbildung 17).

NPP Anteile

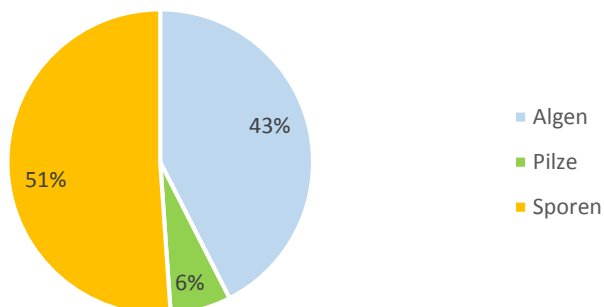


Abbildung 18: Anteile der Nicht Pollen Palynomorphe.

In der Probe sind neben den Pollen auch 53 NPPs enthalten. Dabei handelt es sich um Algen, Sporen und Pilze. Die Sporen haben innerhalb der NPPs einen Anteil von etwa 51%, die Algen einen Anteil von 42% und die Pilze einen Anteil von 6%. (Abbildung 18).

Bei den Sporen wurden sieben unterschiedliche Taxa gefunden: Bryales, *Equisetum*, *Lycopodium*, Polypodiaceae, *Riccia*, *Selaginella* und *Sphagnum* (Abbildung 19). Den größten Anteil haben Laubmoose (Bryales) mit 33%, gefolgt von Torfmoosen (Sphagnum) mit 21% und Tüpfelfarngewächsen (Polypodiaceae) mit 17%.

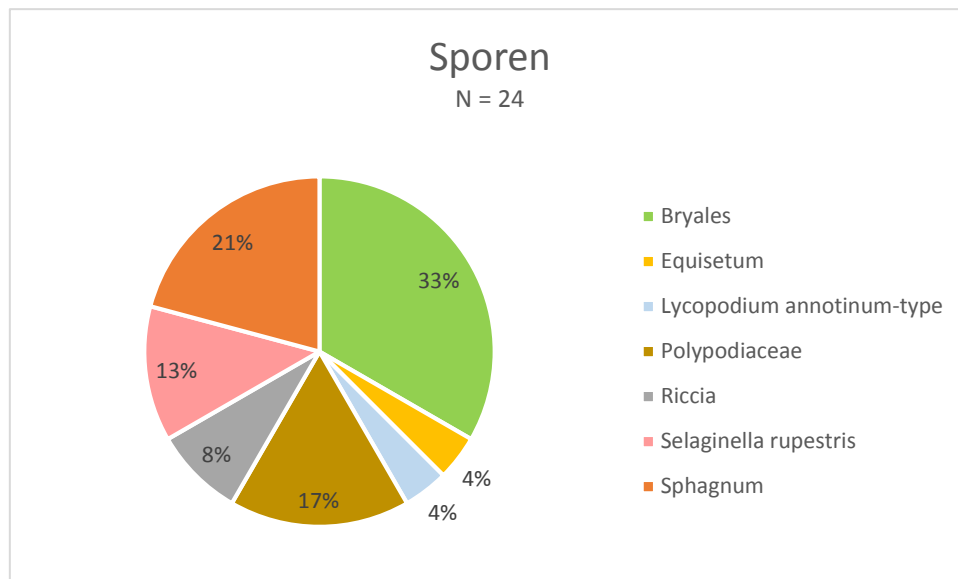


Abbildung 19: Anteile der unterschiedlichen Sporen.

Bei den Algen konnten drei unterschiedliche Typen gefunden werden (Abbildung 20). Den größten Anteil der Algen nehmen mit 45 % die Algen des *Zygnematyps* ein. Die anderen 55% verteilen sich auf *Pediastrum* (30%) und *Botryococcus* (25%).

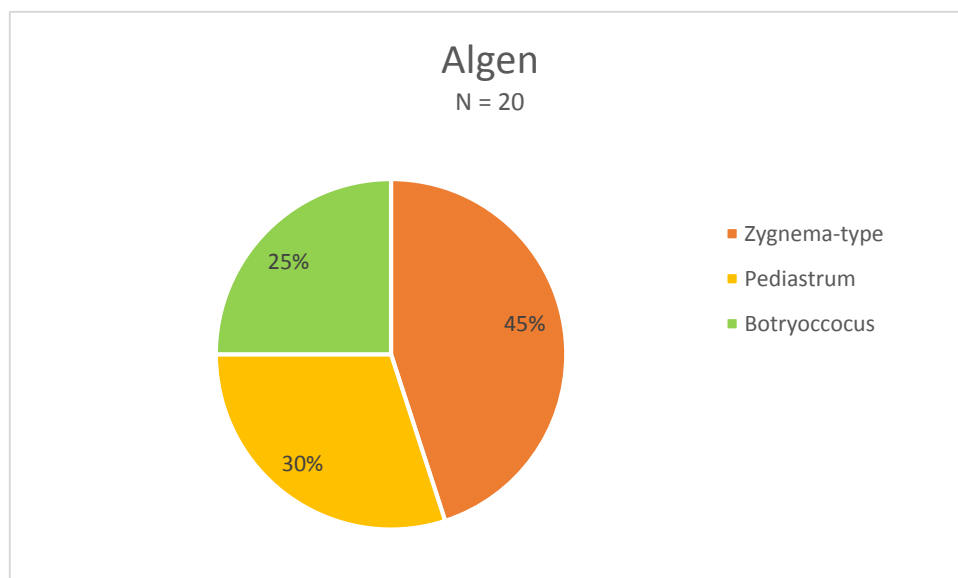


Abbildung 20: Anteile der unterschiedlichen Algen.

Die Pilze waren zu 6% unter den NPPS vertreten. Auch hier gab es nur drei unterschiedliche Pilzgattungen: *Sporormiella*, *Sordaria* und *Cercophora* (Abbildung 21).

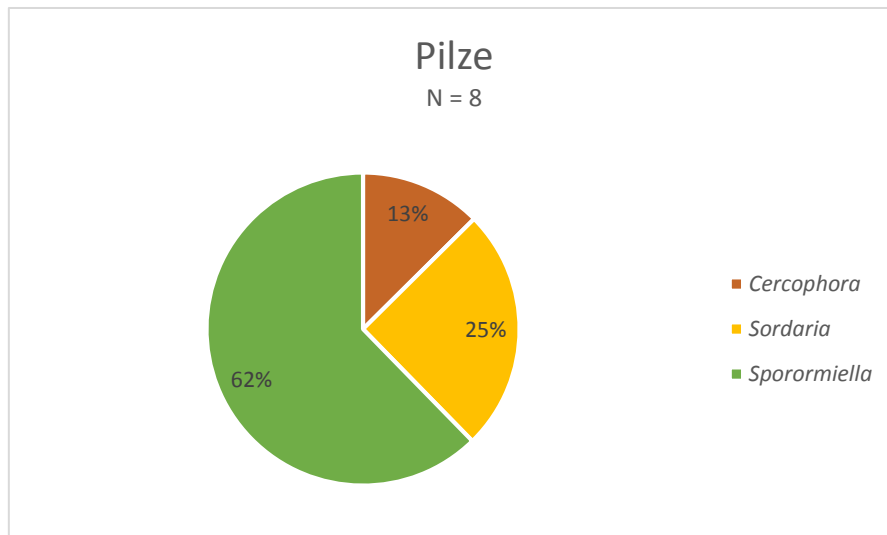


Abbildung 21: Anteile der unterschiedlichen Pilze.

5. Diskussion

5.1 Wahl der Primer und initiale PCRs

Alle verwendeten Primer amplifizierten DNA (Tabelle 10). Daher ist davon auszugehen, dass die Primer gut gewählt sind. Auch die Längen der Amplifikate entsprachen den erwarteten PCR-Produktlängen und zeigten, dass die PCR-Reaktionen der DNA aus den getesteten Torfproben größtenteils erfolgreich waren und keine sichtbaren Fehlamplikate entstanden sind.

Bei einigen PCR-Experimenten blieb das Entstehen eines PCR-Produktes teilweise aus. So konnte im Experiment ES002P mit dem Bryophytenprimer nur in den Subproben des Torfes L14_11 DNA amplifiziert werden (Tabelle 10). Dieses Ergebnis überrascht, da im Vergleichsexperiment ES001P mit demselben Primer in allen Proben DNA nachgewiesen wurde. Ursache könnte sein, dass der PCR-Mastermix im Experiment ES002P nicht ausreichend gemischt wurde und somit nicht alle Chemikalien gleichverteilt in allen Reaktionsgefäßen vorhanden waren. Nach diesem Experiment wurde mit noch größerer Sorgfalt gearbeitet, sodass für alle anderen Experimente Pipettierfehler, unvollständige Durchmischung oder ein falsches PCR-Programm als Fehlerursache ausscheiden.

Ebenfalls auffällig ist, dass in allen Teilproben DNA von allen getesteten Markern, mit Ausnahme der Enchyträen, enthalten zu sein scheint. Bei den Enchyträen konnte nur für einige wenige Proben ein meist sehr schwaches Signal gefunden werden (Tabelle 10). Dies scheint logisch, wenn man sich überlegt, dass in Torfen wegen der anoxischen und meist sauren Bedingungen nur wenige Destruenten

wie Enchyträen lebten. Eine weitere Möglichkeit ist natürlich, dass die entsprechende DNA bereits zersetzt ist und somit kein PCR-Produkt entstehen konnte.

Die Tests auf Diatomeen, Pilze und Gefäßpflanzen waren in allen Teilproben erfolgreich. Auch die Amplifikation der Säugetier-DNA funktionierte problemlos und in den gefundenen Sequenzen konnte keine menschliche DNA amplifiziert werden. Dies bestätigt die saubere Arbeitsweise und die Funktion des verwendeten Blockingprimers (Boessenkool et al. 2012) für Human-DNA.

Ob DNA erfolgreich amplifiziert werden kann, hängt einerseits vom Zustand der DNA ab, andererseits aber auch von der Wahl und der Erfolgsrate der verwendeten Primer. Ein Vergleich mit ähnlichen Experimenten verschiedener anderer Arbeitsgruppen erlaubt es abzuschätzen, inwieweit der Erfolg der initialen PCRs vorhersagbar war. Als unterster Eckpunkt bietet sich eine Studie von Willerslev (Willerslev et al. 2003) an, bei der in 1,5 - 2 Millionen Jahre alten Proben mit verschiedenen Primern keine DNA nachgewiesen werden konnte. Als oberer Eckpunkt dient eine Studie über rezente Molche (Biggs et al. 2015). Hier ist die DNA kaum degradiert. In 99% der Fälle konnte Molch-DNA nachgewiesen werden. Für die meisten anderen Proben liegen die Nachweismöglichkeiten zwischen diesen beiden Extremen. Computersimulationen ergaben für die hier verwendeten Primerpaare für Pilze, Enchyträen und Laubmoose eine maximale taxonomische Abdeckung von 95,2%, 98% bzw. 86% (Epp et al. 2012), sodass man aufgrund des Primerdesigns annehmen kann, dass eine PCR bei ausreichender Menge an Ausgangs-DNA erfolgreich sein wird. Allerdings ergaben in dieser Studie nur rezente Erd- und Sedimentproben durchgehend positive Ergebnisse. Bei zwei 20000 - 50000 Jahre alten Probenserien betrug die Erfolgsrate für das verwendete Pilzprimerpaar 29 - 71% und für das Laubmoosprimerpaar 21%, mit den Primerpaar für die Enchyträen wurden gar keine positiven Ergebnisse erzielt. Hierfür ist vermutlich der Degradationszustand der aDNA verantwortlich. Dieser nimmt in einer Studie von Pedersen (Pedersen et al. 2016) ab einem Alter von ca. 12000 Jahren stark zu. Ist die Degradation zu hoch, kann keine Amplifikation mehr stattfinden.

Nicht immer bedeutet das Alter einer Probe automatisch eine schlechte Ausgangsbasis für eine positive PCR-Reaktion. Zum Beispiel konnten mit dem rbcL-Primer für Kieselalgen an 300.000 - 400.000 Jahren alten Sedimenten verschiedene Pflanzen nachgewiesen werden (Willerslev et al. 2003), während der in dieser Arbeit verwendete Mam16S-Primer für Säugetiere nur für Sedimente mit einem Alter von 20.000 bis 30.000 Jahren oder jünger Proben DNA amplifizierte.

Die in dieser Arbeit verwendete aDNA ist ca. 200.000 Jahre bzw. ca. 20.000 Jahre alt. Daher kann man nicht davon ausgehen, dass das gesamte genetische Material noch komplett und unverändert vorhanden ist. Andererseits sind für viele ähnliche Proben positive Ergebnisse berichtet worden (Epp et al. 2012; Jørgensen et al. 2012; Lydolph et al. 2005; Sønstebo et al. 2010; Willerslev et al. 2003; Willerslev et al. 2014). Die fast durchweg positiven Ergebnisse der initialen PCRs zeigen, dass auch hier die Qualität und Menge der verwendeten DNA meist ausreichend ist. Während sich bei der jüngsten Probe L14_07 aus der Sartan-Eiszeit mit allen Primern mit Ausnahme des Ringelwurmprimers in allen Subproben PCR-Produkte sinnvoller Länge erzeugen ließen, ist das bei den alten Proben in Einzelfällen nicht möglich. Der Grund hierfür ist vermutlich die weiter fortgeschrittene Degradierung der DNA in den Proben, die somit entweder zu schwachen oder keinen Amplifikaten führt (Kapitel 4.1).

5.2 Diversität

5.2.1 Genetik

Die Benutzung ausgewählter gruppenspezifischer Primerpaare schränkt von vornherein die auffindbare Diversität in einer Probe ein. Es ist zum Beispiel unmöglich, mit den verwendeten Primern Vogel-DNA zu identifizieren, da diese weder durch die Pflanzenprimer, die Diatomeenprimer oder die Säugetierprimer amplifiziert werden kann.

Mit der genetischen Analyse der Probe L14-07 konnten jedoch unterschiedliche Algen, Pilze, Moose, Samenpflanzen und Säugetiere bestimmt werden (Tabelle 13). Dabei wurde jedoch immer nur jeweils ein kleiner Teil der in der Probe vorhandenen Algen, Pilze, Pflanzen und Säugetiere erfasst. Das liegt vor allem daran, dass für jedes Amplifikat mittels Klonierung und Sangersequenzierung nur maximal 16 Sequenzen erstellt wurden und mit der Gendatenbank verglichen werden konnten.

Die Tatsache, dass sich in den wenigen ausgewerteten Sequenzen bereits Dopplungen ergaben, könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Diversität der vorhandenen DNA nicht besonders hoch ist. Wahrscheinlicher ist aber, dass sich die Dopplungen ergeben, weil die gefundenen Taxa in der Probe sehr dominant vorkommen und das Signal der eher seltenen Taxa überlagern. Ein weiterer Grund für die Dopplungen könnte auch in den durchgeführten PCR-Reaktionen liegen. Bei PCR-Reaktionen kommt es manchmal zu PCR-Bias, d.h. dass solche DNA-Moleküle, welche einen neutralen GC-Anteil besitzen, effizienter amplifiziert werden und damit in den PCR-Produkten überrepräsentiert sind (Suzuki und Giovannoni 1996). Um mehr unterschiedliche Taxa zu identifizieren, könnte man die Probe noch mit anderen Primern untersuchen und gleichzeitig eine größere Stichprobe analysieren.

Leider war es mit der hier gewählten Methode nur in Einzelfällen möglich, die genaue Art einer Probe zu bestimmen. Im Allgemeinen konnte nur die Familie oder die Gattung bestimmt werden. Einer der Gründe hierfür ist die Wahl des Primers und damit die taxonomische Auflösung des genetischen Markers. Um überhaupt genetische Analysen mit aDNA durchzuführen, muss man Primerpaare wählen, die kurze DNA-Stücke amplifizieren und dennoch eine möglichst hohe taxonomische Auflösung bieten. Die Amplifikationslänge der untersuchten aDNA liegt bei den hier verwendeten Primern bei ca. 50-250 bp (Tabelle 5). Die DNA eng verwandter Pflanzen unterscheidet sich auf den amplifizierten kurzen Stücken manchmal nicht. So kann zum Beispiel das hier verwendete Primerpaar trnlg und trnlh nah verwandte Arten nicht unterscheiden (Taberlet et al. 2007). Das führt beispielsweise dazu, dass es unmöglich ist, *Salix* und *Populus* voneinander zu trennen. Das Problem ist auch für andere Taxa bekannt. Die häufig auftretenden Poaceae können mit demselben Primer nur zu etwa 40% einer Gattung und nur zu 10% einer Art zugeordnet werden (Sønstebo 2010). Mit dem Laubmoosprimerpaar Bryo_P6F und Bryo_P6R können etwa 30% der Arten und 40% der Gattungen identifiziert werden, mit dem Pilzprimerpaar ITS5 und 5.8fungi werden immerhin 60% der Arten erkannt (Epp et al. 2012).

Um mehr unterschiedliche Taxa auf Gattungs- oder Artebene zu identifizieren, sollten Sequenzen direkt analysiert werden. Eine schnelle und kostengünstige Möglichkeit hierfür ist zum Beispiel eine Shotgun-Sequenzierung (Coissac et al. 2016; Pedersen et al. 2016). Hierbei entstehen sehr viele DNA-

Sequenzen, deren Identifikation und Zuordnung zu bestimmten Taxa aber weiterhin durch die Tiefe der Gendatenbank limitiert ist.

5.2.2 Pollenanalyse

Bei der Pollenanalyse werden nur solche Pflanzen erfasst, die Pollen oder Sporen produzieren. Alle anderen Pflanzen werden nicht erfasst, ebenso wie sämtliche Diatomeen und Tiere. Das Signal der erfassbaren Pflanzen ist in der Regel recht vollständig. Allerdings werden nicht alle Pflanzen gleichgut erfasst. Pflanzen, welche viele und sich weit verbreitende Pollen bilden, wie zum Beispiel *Betula*, sind in fast jeder Pollenprobe vorhanden. Diejenigen Pflanzen jedoch, welche nur wenige Pollen bilden oder deren Pollen sich nicht weit verbreiten, sind oft im Pollensignal nur wenig vertreten oder fehlen ganz. Daher ist anzunehmen, dass das gefundene Pollensignal nicht die gesamte Diversität der erfassbaren Pflanzen abdeckt, jedoch alle dominanten Samenpflanzen in der Probe gefunden worden sind.

Bei den in der Probe L14-07 gefundenen Pollen (Tabelle 14) handelt es sich vorrangig um Gräser und krautartige Pflanzen. Außerdem sind einige Pollen von Bäumen wie zum Beispiel *Betula sect. nanae* in der Probe gefunden worden.

Ähnliche Ergebnisse findet man auch in anderen Studien, welche Torfe untersucht haben. So wurde zum Beispiel in bis zu 40.000 Jahren alten Torfproben aus Nordskandinavien, wo im Pleistozän ein ähnliches Klima wie in Nordsibirien herrschte, ein ähnliches Pollensignal gefunden (Parducci et al. 2015). Wie in der hier untersuchten Probe dominieren dort ebenfalls die krautartigen Pflanzen und Gräser. Auch Pollenkörner von Bäumen wie *Betula* oder *Salix* wurden gefunden (Parducci et al. 2015).

Auch Untersuchungen von spätpleistozänen Seesedimenten der Laptevregion zeigen ein ähnliches Pollensignal. Hier wurden neben einigen *Betula*- und *Salix*pollenkörnern vorrangig Gräser und Kräuterpollenkörner gefunden (Andreev et al. 2011).

Der Vergleich der Ergebnisse der untersuchten Probe mit denen einer von Wetterich veröffentlichten Studie an der Küste der Bolshoy Lyahovsky Insel zeigt große Ähnlichkeiten im Pollensignal. Auch hier dominierten Gräser- und Kräuterpollenkörner (Wetterich et al. 2011).

5.2.3 Vergleich DNA-Pollen

Der Vergleich der Pollenanalyse mit den durch genetische Analysen gewonnenen Daten ist hier nur für die Pflanzen möglich. Bei der Pollenanalyse konnten 39 verschiedene Taxa meist auf Gattungsebene bestimmt werden. Die DNA-Analyse ergab 30 unterschiedliche Taxa ebenfalls meist auf Gattungsebene, von denen sich aber nur neun Taxa direkt mit den Pollen vergleichen lassen, da nur diese im Pollensignal gefunden werden können.

Direkte Übereinstimmungen der genetischen Daten und der Daten der Pollenanalyse gibt es in drei Fällen. Bei beiden Methoden wurde *Salix*, *Potentilla* und *Poaceae* gefunden. Einige weitere Übereinstimmungen erhält man, wenn man zulässt, dass die taxonomischen Stufen sich um eine Stufe unterscheiden dürfen. So wurden bei der Pollenanalyse die Ordnung *Bryales* gefunden und im genetischen Signal die Familie der *Bryaceae*. Ein weiteres Beispiel ist die Gruppe der *Anthemideae*, die

in der genetischen Analyse gefunden wurde. In die Gruppe der Anthemideae gehört auch *Artemisia*, welche im Pollensignal mehrfach vorhanden ist.

Der Anteil an Übereinstimmung ist somit zufriedenstellend, sofern man nicht die Gattungen, sondern nur die Familien der gefundenen Taxa miteinander vergleicht. Das ist nicht ungewöhnlich. So wurden z.B. in einer von Pedersen durchgeführten Vergleichsstudie von Pollen und DNA auf dem taxonomischen Familienlevel an grönländischen Proben, bei denen 13 unterschiedliche Familien mittels DNA und 27 Familien mittels Pollenanalyse gefunden wurden, 11 gemeinsame Familien festgestellt (Pedersen et al. 2013). Bei einer Studie von Parducci et al. 2015 an skandinavischen Sedimenten gab es Übereinstimmungen zwischen den Pollen und dem genetischen Signal. Auch hier lag die Zahl der mittels Genetik bestimmten Taxa unter der mit der Pollenanalyse bestimmten Taxa. In einer weiteren Studie (Rawlence et al. 2014), in welcher Ergebnisse von DNA- und Pollenanalysen verglichen wurden, zeigten sich ebenfalls ähnliche Ergebnisse. Die Übereinstimmung zwischen Pollen und DNA betrug ca. 25% und auch hier wurden mehr Taxa mit der Pollenanalyse bestimmt als mittels DNA-Analyse.

Allen Untersuchungen gemein ist, dass mit der DNA und den Pollen unterschiedliche Taxa abgedeckt wurden. So wurden mittels Pollen vorrangig terrestrische Pflanzen nachgewiesen, während im genetischen Signal auch aquatische Pflanzen nachweisbar waren (Pedersen et al. 2013, Parducci et al. 2015). Folglich erhält man, wenn man beide Ergebnisse vergleicht, ein vollständigeres Abbild der Paläobotanik, da mehr Pflanzengruppen abgedeckt werden. Ein Vergleich von Pollen und DNA-Daten ist also in jedem Falle sinnvoll, wenn man die Paläoumwelt rekonstruieren möchte.

5.3 Umweltrekonstruktion

Zur Rekonstruktion des Paläoklimas aus Pflanzenproxies ist es notwendig, die Wachstumsbedingungen der gefundenen Pflanzen möglichst genau zu kennen. Die am häufigsten gefundenen Pflanzen sind Poaceae. Poaceae wachsen in allen Klimazonen unter unterschiedlichsten Umweltbedingungen. Um aus dem Vorhandensein Rückschlüsse ziehen zu können, müsste man die genauen Arten identifizieren. Die zweithäufigste Pflanzengruppe sind die Cyperaceae. Cyperaceae sind ebenfalls in den meisten Klimazonen verbreitet, jedoch bevorzugen sie eher feuchte Standorte (Jäger und Rothmaler 2011). Auch andere im Pollensignal häufige Pflanzen, wie zum Beispiel *Betula nana* oder *Saxifraga* können auf feuchten Böden vorkommen (Jäger und Rothmaler 2011). Die Anwesenheit zahlreicher Moose und Algen bestätigt die ständige Anwesenheit von Feuchtigkeit im damaligen Boden. Das entspricht den Erwartungen, da die Probe aus einem Torf stammt. Auch die vielen unterschiedlichen gefundenen Pilze passen in dieses Bild.

An dem Beprobungsort des Torfes waren auch andere Sedimente aus der Sartan-Eiszeit erhalten. Die linsenförmigen Torfablagerungen bildeten sich möglicherweise beim Verlanden eines Thermokarst-Sees oder eines Flussaltarms. Deshalb erwartet man bei den Pflanzen auch solche Taxa zu finden, welche nicht in Mooren oder Feuchtgebieten heimisch sind, sondern deren Pollen nur in den Boden eingeweht wurden. Solche Pflanzen werden tatsächlich gefunden, z.B. *Artemisia* und Poaceae (Ukrainseva et al. 1993). Das gefundene Spektrum an Pflanzen stimmt teilweise mit gleichaltrigen

Pflanzengemeinschaften aus der gleichen Region Sibiriens überein (Kienast et al. 2001; Andreev et al. 2011; Schirrmeister et al. 2008). Aus diesen Daten wurde eine offene Tundrenlandschaft mit kalten und trockenen Sommern und sehr kalten Wintern abgeleitet. Zu der Tundrenlandschaft passen auch die durch DNA-Analyse hier nachgewiesenen Tiere, nämlich Rentiere und Mammuts. Solche großen Säuger findet man nur in Landschaften mit wenig Bäumen, niedrigen Sträuchern und großen Weidegebieten (Kahlke und Mol 2005).

6. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, inwiefern sich aus drei pleistozänen Torfen der Bolshoy Lyakhovsky Insel Daten zur Rekonstruktion der Paläoumwelt gewinnen lassen. Dazu wurde aus den Torfproben aDNA von verschiedenen Taxa amplifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass in den meisten Proben genügend gut erhaltene DNA vorhanden ist, um eine Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente mit spezifischen genetischen Markern zu ermöglichen. Der Torf, bei dem die genetischen Marker die besten Ergebnisse zeigten, ein ca. 20.000 Jahre alter Torf aus der Sartaneiszeit, wurde mittels Klonierung und Sangersequenzierung weiter untersucht, um DNA-Sequenzen zu erstellen. Die DNA-Sequenzdaten erlaubten durch den Abgleich mit Referenzdatenbanken eine taxonomische Identifikation der aDNA bis auf die Gattungsebene. Insgesamt wurden 30 unterschiedliche Taxa identifiziert, darunter drei Säugetiere, fünf Kieselalgen, acht Pilze, drei Fadenwürmer, vier Moose und sechs unterschiedliche Gefäßpflanzen. Eine gleichzeitig durchgeführte Pollenanalyse an der gleichen Torfprobe ergab 39 unterschiedliche Taxa, von denen es sich bei 25 um Gefäßpflanzentaxa handelt. Die restlichen 14 Taxa wurden den NPPs zugeordnet.

Insgesamt wurden mit der Pollenanalyse also mehr unterschiedliche Taxa gefunden als bei der genetischen Analyse. Ein Grund hierfür ist sicherlich die deutlich größere Stichprobe von 587 Pollen im Vergleich zu den 96 DNA-Sequenzen.

Beim Vergleich der beiden Analyseverfahren konnten nur drei direkte Übereinstimmungen gefunden werden. Das ist beim Vergleich genetischer Daten und den aus Pollen gewonnenen Daten häufig der Fall, da das Pollensignal eher die regionale Vegetation abbildet, während die Analyse der aDNA ein Abbild der lokal vorkommenden Flora zeigt. Für die Paläoumweltrekonstruktion stellt dies aber kein Problem dar. Vielmehr ergänzen sich die Daten der Pollenanalyse und der Genetik. So kann man anhand der hier gefundenen Daten und mithilfe anderer Studien eine trockene Tundrasteppes als Paläoumwelt vermuten, in der sich der Torf nur lokal bildete.

Um genauere Rückschlüsse auf das Paläoklima und die Paläoumwelt ziehen zu können, sind genauere und umfassende Analysen nötig. Es reicht nicht, die untersuchten Proben mittels weniger spezifischer PCRs, welche die auffindbare Diversität stark einschränken, und Pollen zu untersuchen, um Rückschlüsse auf das Klima einer ganzen Region zu gewinnen. Hierfür müssten weitere Proben gleichen Alters an unterschiedlichen Orten der Region gesammelt und genauestens untersucht werden. Hierbei könnte neben der Pollenanalyse vieler Proben zum Beispiel eine Sequenzierung der gesamten in den

Proben enthaltenen genomischen DNA deutlich genauer Aufschlüsse geben. Auch Makrofossilien sollten zur Analyse hinzugezogen werden

7. Danksagung

Diese Bachelorarbeit habe ich am Alfred-Wegener-Institut Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung in Potsdam in der Sektion Periglazialforschung von Prof. Dr. Ulrike Herzschuh angefertigt. Vielen Dank für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, das interessante Thema und das Interesse, welches mir und meinen Ergebnissen entgegengebracht wurde.

Prof. Dr. Martin Trauth (Universität Potsdam) danke ich für seine Bereitschaft, meine Bachelorarbeit als Zweitgutachter zu betreuen.

Außerdem danke ich der gesamten Arbeitsgruppe am AWI für ihre Unterstützung und das angenehme Arbeitsumfeld, besonders aber Heike Zimmermann und Dr. Kathleen Stoof-Leichsenring für die Hilfe im Labor und die hilfreichen Hinweise während der Auswertung der Ergebnisse und des Schreibens der Arbeit. Elena Raschke danke ich besonders für die Durchführung der Pollenanalyse.

8. Anhang

8.1 Chemikalien und Geräte

Tabelle 16: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Extraktion	
PowerMax Soil DNA Isolation Kit + prot K. + DTT	Mo Bio Laboratories
PCRs	
DEPC-H ₂ O	VWR
Sigma Puffer	Sigma
HiFi Puffer	Life Technologies
BSA (20 mg/ml)	Life Technologies
MgSO ₄ (50 mM)	Invitrogen
dNTPs	Qiagen
Sigma Taq Polymerase	Sigma
HiFi Taq Polymerase (5 U/μl)	Life Technologies
Mastermix	Qiagen
Sigma Taq Polymerase	
F-Primer T3 (10 μM)	IDT
R-Primer T7 (10 μM)	IDT
Gelelektrophorese	
Agarose NEEO ultra Qualität, 1kg Roti®Garose	ROTH
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific
GelRed	DNA Stain G Serva
10x/50x TAE Puffer 500 ml	AppliChem Penreac
DEPC-H ₂ O	VWR
Aufreinigung	
Qiagen MinElute PCR Purification kit	Quiagen
Klonierung	
TOPO® TA® Cloning Kit for Sequencing	Quiagen
Agar	Roth
Kanamycin	Sigma-Aldrich

Allgemeine Laborchemikalien

DNA Exitus plus	AppliChem
DNA Away	Molekular BioProducts
Deconex® Labclean	borer
Labosol®D	neoLab
VE-Wasser	AWI

Tabelle 17: Verwendete Geräte & Verbrauchsmaterialien.

Geräte & Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Verbrauchsmaterialien	
Eppendorf-Tubes (300 µl, 1,5 ml)	Eppendorf
96well Platten	
SurPhob Pipettenspitzen	Biozym
Handschuhe Purple Nitrile	Kimtech
Parafilm M	Bemis
Whirlpaks	Nasco
Geräte	
allgemein	
Pipetten	Eppendorf
Kühl- und Eisschränke	Liebherr, ES Series
-80 °C Gefrierschrank	Fryka Kältetechnik
<i>Zentrifugen</i>	
Sprout Minizentrifuge	Biozym
Perfect Spin 24	PeqLab
Sigma 6K15	Sigma
<i>Vortexer</i>	
Vortex-Genie 2	Mo Bio Laboratories
VV3	VWR
Elektrophorese	
PowerPac™ Basic	BioRad
Sub-Cell®Modell 96	BioRad
Transilluminator	UVP
Mikrowelle	Severin
Kamera	Nikon
Waage, Sartorius BL310	Sartorius
Klonierung	
Sterilbank, Hera Save	ThermoFisher Scientific
Inkubator	Binder
MicroPulser	BioRad
GenePulser®Küvetten 0,1 cm	BioRad
PCR	
<i>Cycler</i>	
Professional Thermocycler	Biometra
iCycler	BioRad
TC PLUS	Techne
CL-1000 Ultraviolet Crosslinker	UVP

8.2 Sequenzen der Klone

Tabelle 18: Länge und Abfolge der ausgewerteten Klonsequenzen.

Primer	Proben	Basen	Sequenz
Bryo	ES001P_7_1; ES001P_7_4	54	TATCTTATTTTAAATATACAATAAAATTTGGCTCAGGATTGCTTATATTTTTT
Bryo	ES001P_7_2	49	TTTCTCATTTTAGAATAAGATTTGGCTCAGGATTACCTATATACTTTTT
Bryo	ES001P_7_6; ES001P_7_11; ES001P_7_16	51	AAAAAAATATAAGTAATCCTGAGCCAAATTTTTATTTAAAAAACAAAATA
Bryo	ES001P_7_7	49	AAAAAGTATATAGGTAATCCTGAGCCAAATCTTATTCTAAAATGAGAAA
Bryo	ES001P_7_10; ES001P_7_14	49	TATCTTATTTTGAAAAGAAGATTTGGCTCAGGATCGCTTATACTTTTTT
Bryo	ES001P_7_15	51	TATTTTGTTTTTAAAAAAAATTTGGCTCAGGGTTACTTATATTTTTT
Fungi	ES005P_9_1	274	GTATTTTGTTTTATAGGCTTAGAGCCCATTGACTACATTCTTCATCATTCAATTGGGGTGTATAAAGGTATATAGACCTGGAAATT CAAAGAGAGCTGGCCTTGCGACACAGCAATCCTTGCATCCGCTCCTGAGAGCGAGAGTTATCCAGACCTACGTTAAGTGACACAG GTGGAAAGATAAAAATGACGGGTGTGCACATGCTCCTAGAAGCCAGCTACAACCAACGCCATAGATATTCATTAATGATCCTTC CGCAGGTTACCTACGGAAA
Fungi	ES005P_9_2	172	TTAATTTTATAATTTTCTCAGACTATGACGGGTGATTCAGGTTTATGTTTGGGTCCCCATTGGCAGGCGAGCCTGCCGAGGAAA CGTGTGGTACTCAAAAAGGCAAGGGTTCTATCTCGGCGGGGCCGGAGCCCCACGTTAATGATCCTTCGCGAGGTTACCTACGG AAA
Fungi	ES005P_9_3	220	AACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACAAAAGGAGTCCCCGTACTCTTCATCCCTTTGTGAACCTACCTTTA GTCAGTTGCTTCGGCGGGAGGCCCTGGGAGGGGGCCCCGGGCGCCTGAGCCGGGCTCCCGCCGAGGAGCGCAAACC AAACTCTTGCTGTACCCAGTGGCACGTCCGAGTAAACAAACAAAAACAAGTTAA

Fungi	ES005P_9_5	188	TTAACTATTATATAGTGCTCAGACAATACTGTAATTCAAAGTTTGGGGTTCTCTGGCGGGCACTCACCAGCCGAAGCCAGTAGCC TAAGCGGCCCCGCCAAAGCAACAAGAGTTTATATTCAAGGGTGGAGATCTACCCGTTAGGGCATGAACTCAGTAATGATCCTTCC GCAGGTTACCTACGGAAA
Fungi	ES005P_9_7; ES005P_9_12	287	GTATTAAATTTATAGGCTTTATCAACCTAGTAGAGCGTTCTTTAAACATACATTGGTGTATTTAAATAAATCATAGGCACTGAAGT CAGAAAAAGCCATATTATTTCAATAGCAGATTCCCAACAACCAAAGCGAACTCTGGTTGAATAAAAAATTCTTCAGACCTACGCAT GGTGCACATGGTGGATAGATAAAAAATGACAAGCGAGCACATGCCCATGAGAATGGGCCAGCTACAACCTCATCAGGTTTATTCT GTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA
Fungi	ES005P_9_8	195	GTTACTTTATGGTTTTGTTACATTCTGGACTGGTAGTTAAATGTGATTTGGAAGCGGACGATGCCACAACCAAATGTGGGTGCA CGGGTGTGTGTGGTTTATCAATGGCGTGC GGCCCGAGGGCGCACAGCCAGAGAAAAAGAGTAGCCCGAGGGCCGAATCTTTAA TGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA
Fungi	ES005P_9_9	185	AACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATAATAAGTGTTTTATGGCACTTTTTAAATCCATATCCACCTTGTG TGCAATGTGCGTTGGTTTTCTTTATGGAGACCGACTAAACATCAACCTAATTTTTTTAACTCTTTGTCTGAAAAATATTATGAATA AATAATTCAAATAC
Fungi	ES005P_9_14; ES005P_9_15	199	GTAATTATTATGTTTATTCAGACGCTGATTAATAAATAAAGGTTCAATAGGGTGTCCAATTGGTGGGCAAGCCCACCAAGGA AACATAGGTA CTGAAAAACAAGGGTAATAGACGTGAAGCCACAGGCATGTATTACCACACCTTTGGGCCAGTACTATCATTT AATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA
Fungi	ES005P_9_16	287	GTATTAAATTTATAGGCTTTATCCACCTAGTAGAGCGTTCTTTAAACATACATTGGTGTATTTAAATAAATCATAGGCACTGAAGT CAGAAAAAGCCATATTATTTCAATAGCAGATTCCCAACAACCAAAGCGAACTCTGGTTGAATAAAAAATTCTTCAGACCTACGCAT GGTGCACATGGTGGATAGATAAAAAATGACAAGCGAGCACATGCCCATGAGAAAGGGCCAGCTACAACCTCATCAGGTTTATTCT GTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA
rbcl	ES011P_7_1; ES011P_7_5	76	GATAACTACAGAACCTACTTCTTTAGCATACTCGGCACGTTTGTAGACTTCTTCCATAGTTGCAGCCGTAACGTTT
rbcl	ES011P_7_2	76	AACGACTATAGAACCTACGCTTTTCGCATATTCTGCACGAGCGTAAACTTCTTCCATTGTACCTGCAGTGATGTTT
rbcl	ES011P_7_3; ES011P_7_4;	76	AACA ACTATAGAACCAACGCTTTTCGCATATTCTGCACGAGCGTAAACTTCTTCCATTGTACCAGCAGTGATGTTT

	ES011P_7_6; ES011P_7_7; ES011P_7_11; ES011P_7_12; ES011P_7_13; ES011P_7_14		
rbcL	ES011P_7_8	76	AACGATAACAGAACCAACTGATTTAGCATAGTCTGCACGTTTGTACACTTCTTCCATTGTACCAGCAGTAATGTTT
rbcL	ES011P_7_9	76	AACAACCTATAGAACCAACGCTTTTCGCATATTCTGCACGAGCGTAAACTTCTTCCATTGTACCAGTAGTGATGTTT
rbcL	ES011P_7_10	76	AACAACCTATAGAACCAACGCTTTTAGCATATTCTGCACGAGCGTAAACTTCTTCCATTGTCCCAGCAGTGATGTTT
rbcL	ES011P_7_15	76	AACAACCTATAGAACCAACGCTTTTCGCATATTCTGCACGAGCGTAAACTTCTTCCATTGTACCAGCAGTGATGTTT
Diat_V9	ES012P_7_1; ES012P_7_12	140	CGGAAACCTTGTTACGACTTCTCCTTCTCTAAATGATAAGGTTCAATGGACTTCTCGCGACGTCGGGGCGGCGAACCGCCCC AGTCGCCGCGATCCGAACACTTCACCGGACCATTCAATCGGTAGGAGCGACGGGCG
Diat_V9	ES012P_7_3	137	CGCCCGTCGCATCTCTACCGATTGAATGGTCCGGTGAAGCCTCGGGATTGTGACTGGTTCCCTTTATTGGGAGTCTGTTGCGAG AACTTGTCTAAACCTTATCATTTAGAGGAAGGTGAAGTCGTAACAAGGTTTCC
Diat_V9	ES012P_7_4; ES012P_7_10	136	AGCCACCTTGTTACGACTTTTGCCCGGTTCAAGCCACTGCGATTAAATTGGTTTTACCGGAAGGAAGACCCGAAGGTCCCCGA CCAGCGATCCCCAAGTTTCTCGAAATGGCTCAGTCCCGGGCAGCGACGGGCG
Diat_V9	ES012P_7_6; ES012P_7_9; ES012P_7_11; ES012P_7_13; ES012P_7_15; ES012P_7_16	139	CGCCCGTCGCTCCTACCGATTGAATGGTCCGGTGAAGTGTTTCGGATCGCGGCGACTGGGGCGGTTGCGCGCCCCGACGTCGC GAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCC
Diat_V9	ES012P_7_7	137	GGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCTCTAGATAACGTAGTTCGATCAAATTTCAAAGCAAAGGCACTCGTTAAAGCACCTCT ACCTCGGTCCTAAGACCTCACTAAGTCATCCAATCGGTAGTAGCGACGGGCG

Diat_V9	ES012P_7_8	137	CGCCCGTCGCTCCTACCGATTGGATGACTTAGTGAGGTCTTAGGACCGAAGTAGAGGTGCTTTAACGAGTGCCCTTGCTTTGGA AATTTGATCGAACTACGTTATCTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCC
Diat_V9	ES012P_7_14	137	GGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCCTCTAGATAACGTAGTTCGATCAAATTTCCAAAGCAAGGGCACTCGTTAAAGCACCTCT ACTTCGGTCCTAAGACCTCACTAAGTCATCCAATCGGTAGTAGCGACGGGCG
trnL	HZ090P_7_1	66	TCGCCCTTATCCGATAAGGGCGAATTCGCGGCCGCTAAATTCATTTCGCCCTATAGTGAGTCGTA
trnL	HZ090P_7_2; HZ090P_7_4; HZ090P_7_6; HZ090P_7_7; HZ090P_7_10	53	CTTTTCCTTTGTATTCTAGTTCGAGAACCCCTTGTTTTCTCAAAACACGGAT
trnL	HZ090P_7_8; HZ090P_7_14	51	ATCACGTTTTCCGAAAACAAACAAAGGTTAGAAAAGCGAAAAGAAAAAAAA
trnL	HZ090P_7_12	52	CTTTATTTATTCTCGCTTTATGAAACCTTGTTTGTTTTCATAAAACGGGAT
trnL	HZ090P_7_13	56	CTTTTGATTCTTATTCTGTCTTTATGAACCTTGTTTGTTTTCGAAAAATAGGAT
trnL	HZ090P_7_15	47	CCTTTTCTCGCTTTATAAACTCTGGTTAGTTCGCGTAAACCAGGAT
Mam	ES010P_7_1; ES010P_7_8; ES010P_7_13	93	GAAGAAAAAACCTCCGAACGATATTATAATTCAGACTTTACAAGTCAAGATTCATAATCGCTTATTGACCCAATACTTGATCA ACGGAACA
Mam	ES010P_7_4	90	GTATAAACTAACCTCCGAAAGATTTTAACCAAGACCCACAAGTCAAAGTGACTAAAATCCAATTGACCCAATTCTTTGATCAACG AACCA
Mam	ES010P_7_5; ES010P_7_7; ES010P_7_9; ES010P_7_10;	93	TGTTCCGTTGATCAAGTATTGGGTCAATAAGCGATTAGTGAATCTTGACTTGTAAGTCTGAATTATAATATCGTTCGGAGGTTT TTTTCTTC

	ES010P_7_11; ES010P_7_15		
Mam	ES010P_7_12	91	GAACAGAAAATCCTCCGAGCGATTTTAAAGACTAGACCTACAAGTCAAATCACACAATCGCTTATTGACCCAATACTTGATCAAC GGAACA
Mam	ES010P_7_16	93	GAAGAAAAAACCTCCGAACGATATTATAATTCAGACTTTACAAGTCAAGATTCATAATCGCTTATTACCCAATACTTGATCA ACGGAACA

8.3 Mastermix der Säugetier-PCR

Tabelle 19: Mastermix für die Säugetier-PCR

Chemikalie	Menge (µl)
H ₂ O	12,75
10X (UV)	2,5
dNTPs (2,5 mM)	2,5
BSA (UV, 20 mg/ml)	1
MgSO ₄ (UV, 50 mM)	1
Primermix (10 µM)	1
Blockingprimer (50 µM)	1
HiFi (5U/ul)	0,25
DNA	3
<i>Total</i>	<i>25</i>

8.4 Abkürzungsverzeichnis

aDNA	Alte DNA, ancient DNA
Blank	Negativkontrolle der Extraktion
bp	Basenpaare
ca.	circa
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
HQ	High Quality
kyr	Tausend Jahre
MIS	Marine Isotopic Stage
NPP	Nicht Pollen Palynomorphe
NTC	Negativkontrolle der PCR
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
TAE	Ethylendiamintetraessigsäure Tri/Acetic acid/Ethylenediaminetetraacetic acid
VE-Wasser	Voll entsalztes Wasser
z.B.	zum Beispiel

9. Literaturverzeichnis

- Amaral-Zettler, Linda A.; McCliment, Elizabeth A.; Ducklow, Hugh W.; Huse, Susan M. (2009): A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes. In: *PloS one* 4 (7), e6372. DOI: 10.1371/journal.pone.0006372.
- Andreev, Andrei; Grosse, Guido; Schirrmeister, Lutz; Kuzmina, Svetlana; Novenko, Elena; Bobrov, Anatoly et al. (2004): Late Saalian and Eemian palaeoenvironmental history of the Bol'shoy Lyakhovsky Island (Laptev Sea region, Arctic Siberia). In: *Boreas* 33 (4), S. 319–348. DOI: 10.1080/03009480410001974.
- Andreev, Andrei A.; Schirrmeister, Lutz; Tarasov, P. E.; Ganopolski, Andrey; Brovkin, Viktor; Siegert, Christine et al. (2011): Vegetation and climate history in the Laptev Sea region (Arctic Siberia) during Late Quaternary inferred from pollen records. In: *Quaternary Science Reviews* 30 (17-18), S. 2182–2199. DOI: 10.1016/j.quascirev.2010.12.026.
- Baron, Diethard (Hg.) (2009): Genetik. 5. Dr. Braunschweig: Bildungshaus Schulbuchverl. Westermann (Grüne Reihe Materialien S II, Biologie).
- Biggs, Jeremy; Ewald, Naomi; Valentini, Alice; Gaboriaud, Coline; Dejean, Tony; Griffiths, Richard A. et al. (2015): Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). In: *Biological Conservation* 183, S. 19–28. DOI: 10.1016/j.biocon.2014.11.029.
- Boessenkool, Sanne; Epp, Laura S.; Haile, James; Bellemain, Eva; Edwards, Mary; Coissac, Eric et al. (2012): Blocking human contaminant DNA during PCR allows amplification of rare mammal species from sedimentary ancient DNA. In: *Molecular ecology* 21 (8), S. 1806–1815. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05306.x.
- Brown, Terence A. (2007): Gentechnologie für Einsteiger. 5. Aufl. München u.a.: Elsevier Spektrum Akad. Verl.
- Coissac, Eric; Hollingsworth, Peter M.; Lavergne, Sebastien; Taberlet, Pierre (2016): From barcodes to genomes: extending the concept of DNA barcoding. In: *Molecular ecology* 25 (7), S. 1423–1428. DOI: 10.1111/mec.13549.
- Czihak, G.; Langer, H.; Ziegler, H. (1978): Biologie. 2. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- DPA (2013): "Wiedergeburt des Mammuts": Klon des Urzeit-Elefanten möglich? - N24.de. Online verfügbar unter <http://www.n24.de/n24/Wissen/Mensch-Natur/d/2925210/klon-des-urzeit-elefanten-moeglich-.html#>, zuletzt aktualisiert am 30.08.2016, zuletzt geprüft am 30.08.2016.
- Epp, Laura S.; Boessenkool, Sanne; Bellemain, Eva P.; Haile, James; Esposito, Alfonso; Riaz, Tiayyba et al. (2012): New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems. In: *Molecular ecology* 21 (8), S. 1821–1833. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2012.05537.x.
- Genome List. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>, zuletzt geprüft am 25.08.2016.
- Göttlich, Karlhans (Hg.) (1990): Moor- und Torfkunde. 3. Auflage. Hannover, Stuttgart: Schweizerbart.
- Hofreiter, Michael (2009): Spurensuche in alter DNA. Molekulare Paläontologie. In: *Biol. Unserer Zeit* 39 (3), S. 176–184. DOI: 10.1002/biuz.200910392.

Hubberten, H. (2004): The periglacial climate and environment in northern Eurasia during the Last Glaciation. In: *Quaternary Science Reviews* 23 (11-13), S. 1333–1357. DOI: 10.1016/j.quascirev.2003.12.012.

International Commission on Stratigraphy (2012): Chronostratigraphic Chart 2012. Hg. v. IUGS. Online verfügbar unter <http://www.stratigraphy.org/ICSchart/ChronostratChart2012.jpg>, zuletzt aktualisiert am 15.08.2012, zuletzt geprüft am 05.09.2016.

Jäger, Eckehart J.; Rothmaler, Werner (2011): Exkursionsflora von Deutschland: Gefäßpflanzen. Gefäßpflanzen: Grundband. 20., neu bearb. und erw. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Jørgensen, Tina; Haile, James; Möller, P. E.R.; Andreev, Andrei; Boessenkool, Sanne; Rasmussen, Morten et al. (2012): A comparative study of ancient sedimentary DNA, pollen and macrofossils from permafrost sediments of northern Siberia reveals long-term vegetational stability. In: *Molecular ecology* 21 (8), S. 1989–2003. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05287.x.

Kahlke, Ralf-Dietrich; Mol, Dick (2005): Eiszeitliche Großsäugetiere der Sibirischen Arktis. Die Cerpoplex-Mammuthus-Expeditionen auf Tajmyr. Stuttgart: Schweizerbart in Komm (Senckenberg-Buch, 77).

Kienast, Frank; Siegert, Christine; Dereviagin, Alexandr; Mai, Dieter Hans (2001): Climatic implications of Late Quaternary plant macrofossil assemblages from the Taymyr Peninsula, Siberia. In: *Global and Planetary Change* 31 (1-4), S. 265–281. DOI: 10.1016/S0921-8181(01)00124-2.

Lozán, José L.; Lozán, J. (Hg.) (2014): Warnsignal Klima - die Polarregionen. Wissenschaftliche Fakten ; [Gebiete höchster Empfindlichkeit mit weltweiter Wirkung]. Hamburg: Verl. Wissenschaftliche Auswertungen (Warnsignale), zuletzt geprüft am 26.08.2016.

Lydolph, Magnus C.; Jacobsen, Jonas; Arctander, Peter; Gilbert, M. Thomas P.; Gilichinsky, David A.; Hansen, Anders J. et al. (2005): Beringian paleoecology inferred from permafrost-preserved fungal DNA. In: *Applied and Environmental Microbiology* 71 (2), S. 1012–1017. DOI: 10.1128/AEM.71.2.1012-1017.2005.

Meyer, Hanno; Dereviagin, Alexander; Siegert, Christine; Schirrmeister, Lutz; Hubberten, Hans-W. (2002): Palaeoclimate reconstruction on Big Lyakhovsky Island, north Siberia? Hydrogen and oxygen isotopes in ice wedges. In: *Permafrost Periglac. Process.* 13 (2), S. 91–105. DOI: 10.1002/ppp.416.

Mullis, Kary B.; Faloona, Fred A. (1987): [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: Ray Wu (Hg.): *Recombinant DNA*, Bd. 155. San Diego, Calif.: Academic Press (Methods in Enzymology, 155), S. 335–350.

Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query. Online verfügbar unter https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch, zuletzt geprüft am 22.08.2016.

Parducci, Laura; Valiranta, Minna; Salonen, J. Sakari; Ronkainen, Tiina; Matetovici, Irina; Fontana, Sonia L. et al. (2015): Proxy comparison in ancient peat sediments: pollen, macrofossil and plant DNA. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 370 (1660), S. 20130382. DOI: 10.1098/rstb.2013.0382.

Pedersen, Mikkel W.; Ruter, Anthony; Schweger, Charles; Friebe, Harvey; Staff, Richard A.; Kjeldsen, Kristian K. et al. (2016): Postglacial viability and colonization in North America's ice-free corridor. In: *Nature* 537 (7618), S. 45–49. DOI: 10.1038/nature19085.

Pedersen, Mikkel Winther; Ginolhac, Aurélien; Orlando, Ludovic; Olsen, Jesper; Andersen, Kenneth; Holm, Jakob et al. (2013): A comparative study of ancient environmental DNA to pollen and

- macrofossils from lake sediments reveals taxonomic overlap and additional plant taxa. In: *Quaternary Science Reviews* 75, S. 161–168. DOI: 10.1016/j.quascirev.2013.06.006.
- Press, Frank; Siever, Raymond; Grotzinger, John (2011): Allgemeine Geologie. 5. Aufl., Nachdr. Berlin: Spektrum Akad. Verl. (Spektrum-Lehrbuch).
- Rawlence, Nicolas J.; Lowe, David J.; Wood, Jamie R.; Young, Jennifer M.; Churchman, G. Jock; Huang, Yu-Tuan; Cooper, Alan (2014): Using palaeoenvironmental DNA to reconstruct past environments. Progress and prospects. In: *J. Quaternary Sci.* 29 (7), S. 610–626. DOI: 10.1002/jqs.2740.
- Romanovsky NN. (1958): Paleogeographic conditions of formation of the Quaternary deposits on Bol'shoy Lyakhovsky Island (Novosibirsky Islands). In: *Questions of Physical Geography of Polar region*, S. 80–88.
- Sanger, F.; Coulson, A. R. (1975): A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. In: *Journal of Molecular Biology* 94 (3), S. 441–448. DOI: 10.1016/0022-2836(75)90213-2.
- Schirrmeister, Lutz; Grosse, Guido; Kunitsky, Viktor; Magens, Diana; Meyer, Hanno; Dereviagin, Alexander et al. (2008): Periglacial landscape evolution and environmental changes of Arctic lowland areas for the last 60000 years (western Laptev Sea coast, Cape Mamontov Klyk). In: *Polar Research* 27 (2), S. 249–272. DOI: 10.1111/j.1751-8369.2008.00067.x.
- Schirrmeister, Lutz; Oezen, Deniz; Geyh, Mebus A. (2002): 230Th/U Dating of Frozen Peat, Bol'shoy Lyakhovsky Island (Northern Siberia). In: *Quaternary Research* 57 (2), S. 253–258. DOI: 10.1006/qres.2001.2306.
- Schwamborn, Georg; Wetterich, Sebastian (2015): Russian-German Cooperation CARBOPERM: Field campaigns to Bol'shoy Lyakhovsky Island in 2014. 100 pages / Berichte zur Polar- und Meeresforschung = Reports on Polar and Marine Research; 686; 1-100; ISSN 1866-3192. DOI: 10.2312/BzPM_0686_2015.
- Shendure, Jay; Ji, Hanlee (2008): Next-generation DNA sequencing. In: *Nature biotechnology* 26 (10), S. 1135–1145. DOI: 10.1038/nbt1486.
- Soininen, Eeva M.; Gauthier, Gilles; Bilodeau, Frederic; Berteaux, Dominique; Gielly, Ludovic; Taberlet, Pierre et al. (2015): Highly overlapping winter diet in two sympatric lemming species revealed by DNA metabarcoding. In: *PloS one* 10 (1), e0115335. DOI: 10.1371/journal.pone.0115335.
- Sørnstedt, J. H.; Gielly, L.; Brysting, A. K.; Elven, R.; Edwards, M.; Haile, J. et al. (2010): Using next-generation sequencing for molecular reconstruction of past Arctic vegetation and climate. In: *Molecular ecology resources* 10 (6), S. 1009–1018. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02855.x.
- Stoof-Leichsenring, Kathleen R.; Epp, Laura S.; Trauth, Martin H.; Tiedemann, Ralph (2012): Hidden diversity in diatoms of Kenyan Lake Naivasha: a genetic approach detects temporal variation. In: *Molecular ecology* 21 (8), S. 1918–1930. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05412.x.
- Suzuki, M. T.; Giovannoni, S. J. (1996): Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. In: *Applied and Environmental Microbiology* 62, S. 625–630.
- Taberlet, Pierre; Coissac, Eric; Pompanon, Francois; Gielly, Ludovic; Miquel, Christian; Valentini, Alice et al. (2007): Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. In: *Nucleic acids research* 35 (3), e14. DOI: 10.1093/nar/gkl938.
- Taylor, P. G. (1996): Reproducibility of ancient DNA sequences from extinct pleistocene fauna. In: *MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION* (1), S. 283–285, zuletzt geprüft am 29.08.2016.

Ukraitseva, Valentina V.; Agenbroad, Larry D.; Mead, Jim I.; Hevly, Richard H. (1993): Vegetation cover and environment of the "mammoth epoch" in Siberia. Hot Springs, S.D.?: Mammoth Site of Hot Springs?

Voet, Donald J.; Voet, Judith G.; Pratt, Charlotte W.; Beck-Sickinger, Annette G.; Hahn, Ulrich; Häcker, Bärbel (Hg.) (2010): Lehrbuch der Biochemie. 2., aktualisierte und erw. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH-Verl.

Watson, J. D.; Crick, F.H.C. (1953): Molecular Structure of Nucleic Acids. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. In: *Nature* 171 (4356), S. 737–738. DOI: 10.1038/171737a0.

Wetterich, Sebastian; Rudaya, Natalia; Tumskey, Vladimir; Andreev, Andrei A.; Opel, Thomas; Schirrmeister, Lutz; Meyer, Hanno (2011): Last Glacial Maximum records in permafrost of the East Siberian Arctic. In: *Quaternary Science Reviews* 30 (21-22), S. 3139–3151. DOI: 10.1016/j.quascirev.2011.07.020.

White T, Bruns T, Lee S, Taylor J: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics 1990, S. 315–322, zuletzt geprüft am 29.08.2016.

Whitley, D. Gath (1910): The Ivory Islands in the Arctic Ocean. In: *Journal of the Philosophical Society of Great Britain* XLII, S. 33–57.

Wikipedia (2013): New Siberian Islands. Online verfügbar unter https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b7/New_Siberian_Islands_map.png, zuletzt aktualisiert am 06.10.2013, zuletzt geprüft am 30.08.2016.

Willerslev, Eske; Cooper, Alan (2005): Ancient DNA. In: *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 272 (1558), S. 3–16. DOI: 10.1098/rspb.2004.2813.

Willerslev, Eske; Davison, John; Moora, Mari; Zobel, Martin; Coissac, Eric; Edwards, Mary E. et al. (2014): Fifty thousand years of Arctic vegetation and megafaunal diet. In: *Nature* 506 (7486), S. 47–51. DOI: 10.1038/nature12921.

Willerslev, Eske; Hansen, Anders J.; Binladen, Jonas; Brand, Tina B.; Gilbert, M. Thomas P.; Shapiro, Beth et al. (2003): Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. In: *Science (New York, N.Y.)* 300 (5620), S. 791–795. DOI: 10.1126/science.1084114.

Erklärung

Ich versichere, dass ich, Ellen Schnabel, die Arbeit: Identifikation von Eukaryoten (Algen, Pilzen, Pflanzen und Säugetieren) mittels sedimentärer DNA aus spätpleistozänen Torfen der Insel Bolshoy Lyakhovsky, Russland, selbstständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln (z. B. Nachschlagewerke oder Internet) angefertigt habe. Alle Stellen der Arbeit, die ich aus diesen Quellen und Hilfsmitteln dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen habe, sind kenntlich gemacht und im Literaturverzeichnis aufgeführt. Weiterhin versichere, ich, dass weder ich noch andere diese Arbeit weder in der vorliegenden noch in einer mehr oder weniger abgewandelten Form als Leistungsnachweise in einer anderen Veranstaltung bereits verwendet haben oder noch verwenden werden.

Potsdam, den 20.9.2016

Ellen Schnabel